

**Die extrazelluläre Domäne der humanen Guanylatzyklase C und ihre Liganden:  
Rekombinante Expression, strukturelle Charakterisierung und  
Aktivitätsbestimmung**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Dipl.-Biochem.

**Philipp Richard Weiglmeier**

aus Neunstetten

Bayreuth, 2013



Die vorliegende Arbeit wurde von November 2008 bis September 2013 in Bayreuth am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Paul Rösch angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am:	10.09.2013
Zulassung durch die Promotionskommission:	20.09.2013
Wissenschaftliches Kolloquium:	05.02.2014

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Rhett Kempe

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Paul Rösch	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Clemens Steegborn	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Matthias Breuning	(Vorsitz)
Prof. Dr. Matthias Ullmann	



*„We shall not cease from exploration,  
and the end of all our exploring  
will be to arrive where we started  
and know the place for the first time.“*

***T. S. Eliot, 1942***



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Verbreitung und Unterscheidung <i>E. coli</i> -induzierter sekretorischer Diarrhöen.....	1
1.2	<i>E. coli</i> hitzestabile Enterotoxine.....	3
1.3	Struktur von STa.....	4
1.4	Die Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin.....	7
1.5	Die Humane Rezeptor-Guanylatzyklase C.....	9
1.5.1	Regulation der intestinalen Sekretion durch GC-C.....	9
1.5.2	Die Domänenstruktur von GC-C.....	12
1.5.3	MiniGC-C.....	15
1.6	STa- und Uroguanylin-Analoga als Wirkstoffe zur Behandlung chronischer Verstopfung und des Reizdarmsyndroms.....	16
1.7	Agonisten von GC-C als Diagnostika und Therapeutika für kolorektale Karzinome.....	17
2	Zielsetzung.....	20
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Bakterien- und Hefestämme, Säugerzelllinien.....	21
3.1.1	<i>E. coli</i> XL1 Blue und Top10.....	21
3.1.2	<i>E. coli</i> Origami B (DE3).....	21
3.1.3	<i>P. pastoris</i> GS115.....	22
3.1.4	T84.....	22
3.1.5	COS-7.....	22
3.1.6	HEK 293T.....	23
3.2	Plasmide.....	23
3.2.1	pET32a.....	25
3.2.2	pET43.1a-NusA-C489A und pET43.1a-NusA-Cys-.....	26
3.2.3	pPIC9K.....	27
3.2.4	pCMV_Nrxn.....	28
3.3	Oligonukleotide.....	29
3.4	Nährmedien.....	30
3.4.1	Nährmedien für <i>E. coli</i> .....	30
3.4.2	Nährmedien für <i>P. pastoris</i> .....	31
3.4.3	Nährmedien und Chemikalien für die Kultur von Säugerzellen.....	33
3.5	Enzyme, Proteine, Kits und Standards.....	34

3.6 Sonstige Chemikalien.....	35
3.7 Sonstige Materialien.....	35
3.8 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien und Hefen.....	36
3.9 Konzentration von Proteinen.....	37
3.10 Gelelektrophorese.....	37
3.10.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	37
3.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	38
3.10.3 Western Blot.....	39
3.11 Präparation von Plasmid-DNA.....	41
3.12 Elektrottransformation von Plasmid-DNA in Bakterien und Hefen.....	41
3.13 Fällung von DNA.....	42
3.14 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	42
3.15 Enzymatische Behandlung von DNA .....	43
3.15.1 Restriktion.....	43
3.15.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden.....	43
3.15.3 Ligation.....	44
3.15.4 Polymerase-Kettenreaktion.....	44
3.15.5 Ortsgerichtete Mutagenese.....	45
3.16 Glycerin-Dauerkulturen von <i>E. coli</i> -Klonen.....	45
3.17 Expression von Trx-Prouroguanylin, Trx-Prouro-STh und ihrer mutierten Varianten.....	46
3.18 Lyse der Zellen und Reinigung der Fusionsproteine.....	47
3.19 Entfernen des Fusionsanhangs Trx.....	48
3.19.1 Behandlung mit PreScission-Protease.....	48
3.19.2 Isolierung des Proteins ohne Fusionspartner.....	48
3.20 Freisetzung der Peptide.....	49
3.20.1 Trypsin-Verdau.....	49
3.20.2 Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC).....	49
3.21 Nachweis der biologischen Aktivität.....	50
3.21.1 Kultivierung von T84 Zellen.....	50
3.21.2 DMSO-Dauerkulturen von eukaryotischen Zellen.....	51
3.21.3 <i>In vitro</i> Aktivitätstest.....	52
3.22 Expression von NusA-C489A-MiniGC-C.....	53
3.23 Reinigung von NusA-C489A-MiniGC-C.....	53
3.24 Entfernen des Fusionsanhangs NusA-C489A.....	54



3.24.1 PreScission-Verdau.....	54
3.24.2 Reinigung von MiniGC-C.....	54
3.25 Expression von NusA-Cys <sup>-</sup> -ECD-GC-C und Trx-ECD-GC-C.....	55
3.26 Reinigung von Trx-ECD-GC-C.....	55
3.27 Reinigung von ECD-GC-C aus NusA-Cys <sup>-</sup> -ECD-GC-C.....	56
3.28 Anzucht von <i>P. pastoris</i> .....	57
3.29 Glycerin-Dauerkulturen von <i>P. pastoris</i> Klonen.....	57
3.30 <i>In vivo</i> Selektion von <i>P. pastoris</i> Klonen mit multiplen Plasmidinsertionen.....	57
3.31 Selektion von Klonen mit dem Methanol-Abbau-Phänotyp Mut <sup>+</sup> .....	58
3.32 Expressionstests von <i>P. pastoris</i> in Schüttelkulturen.....	58
3.33 Fermentation von <i>P. pastoris</i> .....	59
3.34 Expression von rekombinanten Proteinen in COS-7 und HEK 293T.....	60
3.34.1 Zellanzucht.....	60
3.34.2 Transfektion und Proteinexpression.....	60
3.34.3 Reinigung von sekretiertem Protein aus dem Kulturüberstand.....	61
3.34.4 Thrombin-Spaltung.....	62
3.35 Größenausschluss-Chromatographie.....	62
3.36 Massenspektrometrie.....	63
3.37 CD-Spektroskopie.....	63
3.37.1 Probenvorbereitung.....	63
3.37.2 Messbedingungen.....	64
3.38 NMR-Spektroskopie.....	64
3.38.1 Probenvorbereitung.....	64
3.38.2 Allgemeine Messbedingungen und Verfahren.....	65
3.38.3 Prozessierung und Analyse von NMR-Spektren.....	66
3.38.4 Homonukleare Experimente.....	66
3.38.5 Heteronukleare Experimente.....	67
3.38.6 Aufnahmeparameter der in dieser Arbeit gemessenen NMR-Experimente.....	68
3.38.7 Homonukleare Zuordnung.....	69
4 Ergebnisse.....	71
4.1 Rekombinante Expression und Charakterisierung von humanem Uroguanylin.....	71
4.1.1 Reinigungsstrategie für rekombinantes Uroguanylin.....	71
4.1.2 Expression in <i>E. coli</i> Origami B (DE3).....	72
4.1.3 Reinigung von rekombinantem Prouroguanylin.....	73

4.1.3.1 Zellaufschluss und Reinigung des Fusionsproteins Trx-Prouroguanylin.....	73
4.1.3.2 Spaltung des Fusionsproteins mit PreScission-Protease.....	74
4.1.4 NMR-Spektroskopie mit <sup>15</sup> N-markiertem Prouroguanylin.....	76
4.1.5 Freisetzung von Uroguanylin.....	77
4.1.6 NMR-spektroskopische Charakterisierung von rekombinantem Uroguanylin.....	80
4.2 Rekombinante Herstellung von <i>E. coli</i> STh durch Prosequenz-Austausch.....	82
4.2.1 Das Konstrukt pET32a-Asp-pres-Prouro-STh.....	83
4.2.2 Expression von pET32a-Asp-pres-Prouro-STh in <i>E. coli</i> Origami B (DE3).....	84
4.2.3 Reinigung von Prouro-STh.....	85
4.2.3.1 Zellaufschluss und Reinigung von Trx-Prouro-STh.....	85
4.2.3.2 Spaltung von Trx-Prouro-STh mit PreScission-Protease.....	87
4.2.4 [ <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N]-HSQC-Spektrum von <sup>15</sup> N-markiertem Prouro-STh.....	88
4.2.5 Trypsin-Verdau von Prouro-STh.....	89
4.2.6 NMR-Spektroskopie mit rekombinantem STh.....	91
4.2.7 Biologische Aktivität von rekombinantem Uroguanylin und STh.....	93
4.3 Expression und Charakterisierung der mutierten Peptide Uroguanylin A3R D6E, Uroguanylin $\Delta_{TIA}$ D6E, STh L9Y und STh Y5R L9Y.....	96
4.3.1 Herstellung der Konstrukte durch ortsgerichtete Mutagenese.....	97
4.3.2 Expression und Reinigung der Peptide.....	98
4.3.3 Massenspektrometrie.....	99
4.3.4 Charakterisierung von STh L9Y und STh Y5R L9Y.....	101
4.3.5 Aktivität von Uroguanylin A3R D6E und Uroguanylin $\Delta_{TIA}$ D6E.....	103
4.4 Extrazelluläre Fragmente von GC-C.....	104
4.4.1 Expression und Charakterisierung von MiniGC-C.....	105
4.4.1.1 Expression in Origami B (DE3).....	105
4.4.1.2 Reinigung von MiniGC-C.....	106
4.4.1.3 Größenausschlusschromatographie.....	108
4.4.1.4 CD-Spektroskopie mit MiniGC-C.....	110
4.4.1.5 NMR-Spektroskopie mit MiniGC-C.....	110
4.4.1.6 Bindungsstudien mit Uroguanylin und STh.....	112
4.4.2 Expression der gesamten extrazellulären Domäne von GC-C (ECD-GC-C) in <i>E. coli</i> .....	114
4.4.2.1 Expression von Trx-ECD-GC-C und NusA-Cys <sup>-</sup> -ECD-GC-C in <i>E. coli</i> .....	115
4.4.2.2 Reinigung von Trx-ECD-GC-C und NusA-Cys <sup>-</sup> -ECD-GC-C.....	116

4.4.2.3	Größenausschluss-Chromatographie.....	119
4.4.2.4	NMR-Titration von Uroguanylin mit NusA-Cys <sup>-</sup> -ECD-GC-C.....	121
4.4.3	Expression der extrazellulären Domäne von GC-C in <i>Pichia pastoris</i> .....	122
4.4.3.1	Klonierung von pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis und Identifizierung von geeigneten Expressionsklonen.....	123
4.4.3.2	Expressionstest.....	126
4.4.3.3	Fermentation von <i>P. pastoris</i> GS115 pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis.....	128
4.4.4	Expression der extrazellulären Domäne von GC-C in Säugerzellen.....	131
4.4.4.1	DNA-Konstrukt für die Expression der ECD von GC-C .....	131
4.4.4.2	Expressionsversuche in HEK 293T und COS-7 Zellen.....	131
4.4.4.3	Einfluss der Glykosylierung auf die Expression von ECD-GC-C-Thr-IgG in HEK 293T.....	133
4.4.4.4	Stabilität von isoliertem ECD-GC-C-Thr-IgG.....	135
5	Diskussion.....	137
5.1	Rekombinante Expression von Uroguanylin.....	137
5.2	Rekombinante Expression von <i>E. coli</i> STh durch Prosequenz-Austausch.....	141
5.3	Die von Uroguanylin und STh abgeleiteten Peptide Uroguanylin A3R D6E, Uroguanylin $\Delta_{TIA}$ D6E, STh L9Y und STh Y5R L9Y.....	146
5.4	Vergleich der Ausbeuten bei der Herstellung der verschiedenen GC-C-Agonisten.....	150
5.5	Reinigung und Charakterisierung von MiniGC-C.....	151
5.6	Expression der gesamten ECD von GC-C in <i>E. coli</i> .....	154
5.7	Expression der ECD von GC-C in <i>P. pastoris</i> .....	157
5.8	Expression der ECD von GC-C in Säugerzellen.....	159
5.9	Schlussbemerkung.....	161
6	Zusammenfassung.....	163
7	Summary.....	165
8	Literaturverzeichnis.....	167
8.1	Allgemeines Literaturverzeichnis.....	167
8.2	Eigene Veröffentlichungen.....	190
9	Abkürzungsverzeichnis.....	191
10	Anhang.....	194
10.1	Sequenzen der verwendeten Plasmide.....	194
10.1.1	pET32a-Asp-pres-prouroguanylin.....	194
10.1.2	pET32a-Asp-pres-Prouro-STh.....	194

---

10.1.3	pET32a-Asp-pres-Prouro-STh-L78Y.....	195
10.1.4	pET32a-Asp-pres-Prouro-STh-Y74R-L78Y.....	196
10.1.5	pET32a-Asp-pres-prouroguanylin-A72R-D75E.....	196
10.1.6	pET32a-Asp-pres-prouroguanylin- $\Delta$ (70-72)-D75E.....	197
10.1.7	pET43.1a-NusA-C489A-miniGC-C.....	197
10.1.8	pET32a-ECD-GC-C.....	198
10.1.9	pET43.1a-NusA-Cys <sup>-</sup> -ECD-GC-C.....	200
10.1.10	pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis.....	202
10.1.11	pCMV_Nrxn-ECD-GC-C-Thr.....	204
10.2	Chemische Verschiebungen von rekombinantem Uroguanylin.....	206
10.3	Chemische Verschiebungen von rekombinantem STh.....	209
10.4	Geräteliste.....	211
11	Danksagung.....	213
12	(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen.....	215

## 1 Einleitung

### 1.1 Verbreitung und Unterscheidung *E. coli*-induzierter sekretorischer Diarrhöen

Diarrhö-Erkrankungen stehen unter den weltweit häufigsten Todesursachen von Kindern unter fünf Jahren an zweiter Stelle, nach Lungenentzündungen (Lopez *et al.*, 2006). Sie fordern jährlich etwa 1,5 Mio. Opfer und damit mehr als Aids, Malaria und Masern zusammen (Wardlaw *et al.*, 2010). Neben pathogenen Viren und Protozoen stellen diarrhöogene Enterobakterien wie *Camphylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* und *Vibrio cholerae* eine Hauptgruppe von Verursachern enterischer Erkrankungen dar (Parashar *et al.*, 2006; Niyogi, 2005; Navaneethan & Giannella, 2008). Auch einige pathogene Varianten von *Escherichia coli* (*E. coli*) gehören zu dieser Gruppe. Als fakultativer Anaerobier besiedelt *E. coli* den Darmtrakt von Säugetieren, meist zu beiderseitigem Nutzen. Jedoch existieren hochangepasste Stämme, welche starke sekretorische Diarrhöen, Dysenterien und Symptome außerhalb des Darms wie akutes Nierenversagen hervorrufen können (Nataro & Kaper, 1998). Basierend auf pathogenen Mechanismen und klinischen Syndromen unterscheidet man dabei fünf Gruppen diarrhöogener *E. coli* (Baldi *et al.*, 2009):

- enterotoxische *E. coli* (ETEC) rufen durch die Sezernierung von Enterotoxinen, welche die Elektrolyt-Homöostase im Darm stören, wässrige Diarrhöen hervor,
- enteropathogene *E. coli* (EPEC) lösen durch ihre intime Adhärenz an das Darmepithel und eine induzierte Reorganisation des epithelialen Cytoskeletts wässrige Diarrhöen aus,
- enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) führen durch die Produktion von Cytotoxinen wie dem Shigatoxin und Enterohämolysin zu schweren Gewebeschädigungen wie hämorrhagischer Colitis (HC) und in einigen Fällen dem Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS) (Ramamurthy, 2008),
- enteroaggregative *E. coli* (EAEC) bilden einen Biofilm mit dem epithelialen Mucus des Darms was mit Schädigungen des Darmepithels und oftmals persistenter Diarrhöe verbunden ist. Daneben können sie ebenfalls Enterotoxine sekretieren (Savarino *et al.*, 1993b)
- enteroinvasive *E. coli* (EIEC) dringen in die Darmepithelzellen ein und verbreiten sich dort, was mit Dysenterie und starken Entzündungen einhergeht.

Zwar treten endemische bakteriell verursachte Diarrhöen, bedingt durch die wesentlich schlechteren sanitären Verhältnisse, in erster Linie in Entwicklungsländern auf. Jedoch zeigen Vorfälle wie der 2011 in Deutschland erfolgte Ausbruch des Shigatoxin-produzierenden *E. coli* Serotyps O104:H4, dass einige pathogene Darmkeime auch die hochentwickelten Gesundheitssysteme des Westens vor erhebliche Herausforderungen stellen können (Wu *et al.*, 2011; Friedrich, 2011). Dies gilt umso mehr als auch bei diesen Stämmen eine Zunahme erworbener Antibiotika-Resistenzen zu beobachten ist (Mendez Arancibia *et al.*, 2009). Dabei dienen die oben erwähnten fünf Gruppen diarrhöogener *E. coli* nur einer groben Einteilung. Da viele Virulenzgene in sog. Pathogenizitätsinseln auf dem Chromosom organisiert sind oder auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden (Moseley *et al.*, 1983), Phagen und Transposons (Moseley *et al.*, 1983; So & McCarthy, 1980; Dallas, 1990) vorkommen, sind die Möglichkeiten für horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Stämmen vielfältig und viele pathogene *E. coli* Stämme tragen Virulenzfaktoren die mehreren Gruppen zuordenbar sind. So zeichnet sich der 2011 in Deutschland mit dem gehäuften Auftreten von HUS-Erkrankungen in Verbindung gebrachte Stamm durch einen Phänotyp aus der sowohl EHEC als auch EAEC zugeordnet werden kann (Bielaszewska *et al.*, 2011; Bezuidt *et al.*, 2011).

Von den oben erwähnten fünf Gruppen von Diarrhö auslösenden *E. coli* ist ETEC die am weitesten verbreitete. ETEC Infektionen sind die häufigste Ursache für Durchfallerkrankungen bei Kindern in Entwicklungsländern (Levine *et al.*, 1993; Albert *et al.*, 1995; Okeke, 2009), v. a. innerhalb der ersten beiden Lebensjahre (Rao *et al.*, 2003; Qadri *et al.*, 2007).

ETEC Infektionen gelten außerdem als Hauptverursacher der sog. Reisediarrhö, die bei Reisenden in Entwicklungsländern auftritt (Northey *et al.*, 2007) (Abb. 1.1). Insgesamt ist ETEC schätzungsweise für jährlich 200 Mio. Durchfallepisoden und 380.000 Todesfälle verantwortlich (Wenneras & Erling, 2004; WHO 2006). Die Infektion erfolgt in der Regel durch die Aufnahme verunreinigten Wassers oder verunreinigter Lebensmittel, welche in Regionen mit endemischen Infektionen typischerweise große Mengen an ETEC enthalten (Ryder *et al.*, 1976; Wood *et al.*, 1983). Da relativ viele Keime ( $> 10^8$  CFU) aufgenommen werden müssen damit eine Infektion erfolgt kommen Übertragungen von Mensch zu Mensch nicht vor (Levine *et al.*, 1977; Levine *et al.*, 1980).



Abb. 1.1: Risikogebiete für Infektionen mit Reisediarrhö weltweit. Unterscheidung in Regionen mit hohem (dunkelgrau), mittlerem (hellgrau) und geringem (weiß) Risiko (verändert nach Baldi et al., 2009).

## 1.2 *E. coli* hitzestabile Enterotoxine

Nach erfolgter Infektion kolonisiert ETEC die menschliche Dünndarmschleimhaut. Die Adhärenz an die epithelialen Darmzellen wird dabei von einer äußerst diversen Gruppe von Kolonisierungsfaktoren vermittelt (Wolf, 1997; Fleckenstein *et al.*, 2010; Rodas *et al.*, 2011). Der pathogene Phänotyp der Infektion beruht auf der Wirkung sog. Enterotoxine. Darunter versteht man Proteine und Peptide die vom Bakterium sekretiert werden und in die Regulation der intestinalen Elektrolyt- und Wasserhomöostase eingreifen (Sears & Kaper, 1996). Das Vorhandensein von Genen, die für Enterotoxine kodieren, ist das entscheidende Kriterium für Enterotoxizität in einem *E. coli* Klon (Turner *et al.*, 2006). ETEC kann sowohl hitzelabile (LT) als auch hitzestabile (ST) Enterotoxine exprimieren (Evans *et al.*, 1973; Sack, 2011). LT sind heteromere Proteine, die aus einer katalytischen A-Untereinheit und einer pentameren B-Untereinheit bestehen. Während die B-Untereinheiten die Bindung an die Epithelzellen vermitteln, wird die A-Untereinheit ins Zellinnere gebracht, wo sie durch ADP-Ribosylierung des regulatorischen G-Proteins Gs $\alpha$  die Bildung von intrazellulärem 3',5'-zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylatzyklase

stimuliert. Dies führt zu einer von der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) vermittelten Aktivierung von Ionenkanälen und schließlich zur Sekretion von Anionen ins Darmlumen. LT und das Cholera-toxin aus *V. cholerae* sind sich in Sequenz (80% Identität), Struktur und Wirkmechanismus sehr ähnlich (Spangler, 1992). Die hitzestabilen Enterotoxine sind kleine cysteinreiche Peptide deren namensgebendes Charakteristikum die Tatsache ist, dass sie im Gegensatz zu LT selbst nach 60-minütiger Inkubation bei 95 °C noch ihre Aktivität behalten (Sack, 1975; Greenberg & Guerrant, 1981). Es werden zwei Klassen von ST unterschieden, die sich sowohl in Struktur als auch Wirkmechanismus deutlich unterscheiden: STa bindet an die intestinale Rezeptor-Guanylatzyklase C und induziert Diarrhö durch eine von 3',5'-zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) abhängige Aktivierung des Anionenkanals CFTR (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Dagegen ist die Wirkung von STb unabhängig von zyklischen Nucleotiden und wird von einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vermittelt (Dreyfus *et al.*, 1993). STb wird mit Diarrhöen bei Schweinen in Verbindung gebracht und wurde bisher noch nicht als Auslöser menschlicher Erkrankungen identifiziert (Lortie *et al.*, 1991). Die folgende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit hitzestabilen Enterotoxinen des STa-Typs (Weiglmeier *et al.*, 2010).

Neben ETEC wurden eine Reihe weiterer Darmbakterien identifiziert, welche hitzestabile Enterotoxine sekretieren, die entweder mit STa identisch oder sehr homolog sind. Dazu zählen Stämme von *Yersinia enterocolitica* (Takao *et al.*, 1984; Pai & Mors, 1978), *Klebsiella pneumoniae* (Klipstein *et al.*, 1983; Albano *et al.*, 2000), *Citrobacter freundii* (Guarino *et al.*, 1987), *Vibrio cholerae* (Takeda *et al.*, 1991; Takao *et al.*, 1985) und *Vibrio mimicus* (Arita *et al.*, 1991). Enteroaggregative *E. coli* exprimieren das hitzestabile Enterotoxin EAST1 welches ebenfalls strukturelle Ähnlichkeiten zu STa aufweist und für dessen Wirkung der gleiche Mechanismus angenommen wird (Savarino *et al.*, 1993a; Menard & Dubreuil, 2002; Menard *et al.*, 2004).

### 1.3 Struktur von STa

Zwei molekulare Spezies von STa wurden in ETEC-Stämmen identifiziert und mit STp (*porcine*) und STh (*human*) bezeichnet, da sie jeweils zuerst in aus Schweinen bzw. Menschen isolierten Stämmen entdeckt wurden. Beide Varianten wirken jedoch gleichermaßen pathogen in Menschen. Sie bestehen aus 18 (STp) bzw. 19 (STh) Aminosäuren und enthalten jeweils sechs Cysteine, welche in einem charakteristischen 1-4/2-5/3-6 Muster Disulfidbrücken ausbilden (Shimonishi *et al.*, 1987) (Abb. 1.2). Dieses Verbrückungsmuster verleiht den Peptiden ihre außerordentliche



Hitzestabilität und schützt sie vor proteolytischem Abbau. Der 13 Aminosäuren lange Sequenzbereich der STa-Peptide, der die drei Cystinbrücken enthält, ist in den verschiedenen Peptiden stark konserviert und wird als toxische Domäne bezeichnet, da er notwendig und hinreichend für die Enterotoxizität der Peptide ist (Yoshimura *et al.*, 1985). Die toxische Domäne weist große Ähnlichkeit mit Sequenzbereichen der Peptidhormone Guanylin (Currie *et al.*, 1992) und Uroguanylin (Hamra *et al.*, 1993) aus Säugetieren auf (Abb. 1.2). Diese ebenfalls cysteinreichen Peptide sind die endogenen Liganden der Guanylatzyklase C und damit wesentlich an der Regulation des Elektrolythaushalts im Darm beteiligt. Sie enthalten zwei Disulfidbrücken die in einem 1-3/2-4 Muster angeordnet sind. Zuletzt wurde im Opossum das Peptid Lymphoguanilin auf mRNA-Ebene identifiziert und als weiterer Vertreter dieser Gruppe von parakrinen Hormonen vorgeschlagen (Forte *et al.*, 1999).

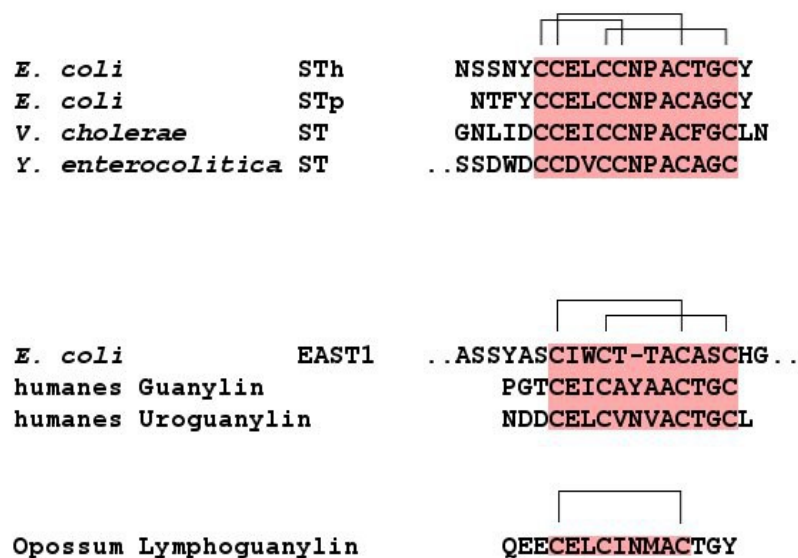


Abb. 1.2: Primärstrukturen bakterieller hitzestabiler Enterotoxine sowie der endogenen Peptidhormone Guanylin, Uroguanylin und Lymphoguanilin. Disulfidbrücken sind durch Klammern angedeutet und die Kernregionen bzw. toxischen Domänen sind unterlegt.

STa-Bindung an GC-C führt zu deren Überaktivierung und damit zu einer verstärkten Sekretion von Ionen und H<sub>2</sub>O ins Darmlumen. Die Struktur von STa ist den Strukturen der aktiven Hormone Guanylin und Uroguanylin sehr ähnlich (Abb. 1.3). Das proteolytisch stabile STa wirkt als langlebiger Superagonist von Guanylin und Uroguanylin (Carpick & Garipey, 1993). Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Peptidhormonen Guanylin und Uroguanylin auf der einen Seite und den hitzestabilen Enterotoxinen auf der anderen Seite deutet auf eine konvergente

Evolution beider Peptidgruppen hin und STh gilt als Beispiel molekularen Mimikrys, das hier von Bakterien eingesetzt wird um die eigene Verbreitung zu gewährleisten (Lin *et al.*, 2010b). Dies spiegelt sich auch im relativen Beitrag wider, den die einzelnen Disulfidbrücken von STa zur Aktivität des Peptids leisten. Experimente, bei denen Disulfidbrücken durch paarweisen Austausch von Cystein durch Alanin aus STa eliminiert wurden, haben gezeigt, dass ein aktives Peptid mindestens die 2-5-Disulfidbrücke sowie eine weitere Disulfidbrücke enthalten muss. Dabei ist ein STa-Analogon, welches die beiden in Guanylin und Uroguanylin realisierten Disulfidbrücken (2-5/3-6) enthält, in kompetitiven Radioligandenbindungstests etwa 130 mal schwächer aktiv als STa, während ein Peptid welches die 1-4/2-5 Konnektivitäten enthält, etwa 4200 mal schwächer aktiv als STa ist (Garipey *et al.*, 1987; Yamasaki *et al.*, 1988; Tian *et al.*, 2008).

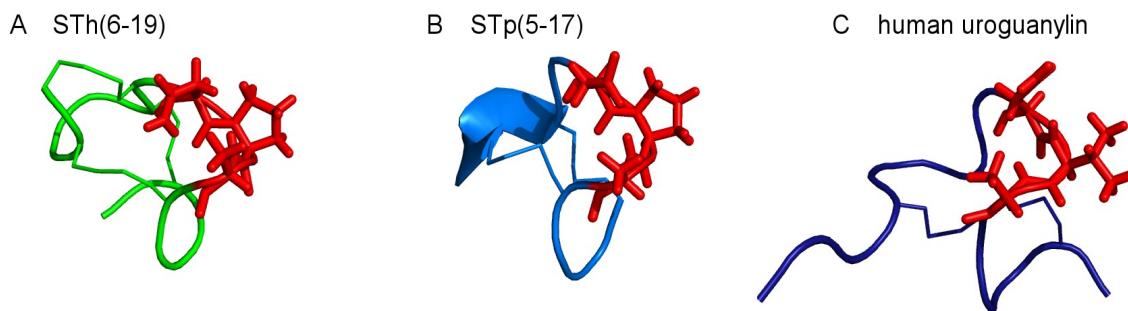


Abb. 1.3: Vergleich der Lösungsstruktur von STh(6-19) (Matecko *et al.*, 2008), der Kristallstruktur von STp(5-17) (Ozaki *et al.*, 1991) (PDB: 1ETN) und der Lösungsstruktur von humanem Uroguanylin (Marx *et al.*, 1998) (PDB: 1UYA). Die Rezeptorbindungsregionen sind mit Seitenketten in rot dargestellt.

Strukturell besteht STh aus einer rechtshändigen Spirale, die durch die Cystine stabilisiert wird. Das Peptidrückgrat bildet zwischen Cys-6 und Cys-10 eine  $3_{10}$ -Helix, sowie eine  $\beta$ -Kehre vom Typ I zwischen Asn-12 und Cys-15 und eine  $\beta$ -Kehre vom Typ II zwischen Cys-15 und Cys-18 (Ozaki *et al.*, 1991). Die Disulfidbrücke zwischen Cys-5 und Cys-11 hat eine bei Proteinen seltene rechtshändige Konformation, während sich die anderen beiden Disulfidbrücken in einer linkshändigen Spirale anordnen (Sato *et al.*, 1994), die bei Proteinen weit häufiger anzutreffen ist (Richardson, 1981). Die Struktur wird durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, die mehrheitlich von den Peptidgruppen des Rückgrats gebildet werden. Das Gesamtpeptid ist relativ hydrophob, da alle Seitenketten nach außen orientiert sind. Dadurch erklärt sich, dass STa im Gegensatz zu STb in Methanol löslich ist (Nair & Takeda, 1998). Die  $\beta$ -Kehre, die von Asn-12,

Pro-13 und Ala-14 gebildet wird (Matecko *et al.*, 2008) gilt als Rezeptorbindungsstelle. Punktmutationen von Asn-12 oder Ala-14 führen zu einer stark verminderten Bindung von STh an GC-C (Carpick & Gariepy, 1991). Auch für den Sequenzabschnitt von Cys-6 bis Leu-9 wurde ein Beitrag zur Bindung an den Rezeptor vorausgesagt (Wolfe *et al.*, 2002).

#### 1.4 Die Peptidhormone Guanylin und Uroguanylin

Sowohl Guanylin als auch Uroguanylin wurden als endogene Liganden von GC-C identifiziert (Khare *et al.*, 1994; Kita *et al.*, 1994). Die Gene beider Peptide, GUCA2A und GUCA2B, sind bei Menschen auf dem Chromosom 1 in enger Nachbarschaft zueinander kodiert (Whitaker *et al.*, 1997). Was ihre Expressionsmuster und ihre Verteilung in verschiedenen Geweben angeht, unterscheiden sie sich jedoch deutlich voneinander. So konnte Guanylin bei Ratten sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm, nicht jedoch im Urin, nachgewiesen werden. Uroguanylin wurde dagegen im Zwölffingerdarm und Urin, jedoch nicht im Kolon gefunden (Fan *et al.*, 1997). Daneben wurde Uroguanylin in den Nierenkanälchen und im Magen identifiziert (Nakazato *et al.*, 1998). Guanylin wird von den sog. Becherzellen des Dün- und Dickdarms, die auch für die Schleimbildung verantwortlich sind, sekretiert (Cohen *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995). Dagegen sind enterochromaffine Zellen für die Produktion von Uroguanylin zuständig. Diese ist im Jejunum am höchsten und nimmt in Richtung des distalen Dünndarms ab (Perkins *et al.*, 1997). Das Expressionsmuster beider Hormone spiegelt Unterschiede in der pH-Abhängigkeit ihrer Aktivität wider. Während Guanylin im leicht basischen Milieu, bei etwa pH 8, mit der höchsten Affinität an den Rezeptor GC-C bindet, liegt das pH Optimum für die Uroguanylin-Bindung im Sauren, bei etwa pH 5 (Hamra *et al.*, 1997). Beim Opossum wurde auf mRNA-Ebene ein weiteres zu Uroguanylin homologes Hormon identifiziert, das ebenfalls GC-C aktivieren kann (Forte *et al.*, 1999; Fonteles *et al.*, 2001), jedoch wurde das entsprechende Peptid bisher nicht direkt nachgewiesen.

Nach der Aufnahme größerer Mengen Salz werden Guanylin und Uroguanylin in das Darmlumen abgegeben, wo sie die Absorption von Na<sup>+</sup> inhibieren und zu einer verstärkten Sekretion von Cl<sup>-</sup> und Wasser führen (Sindic & Schlatter, 2005; Fonteles & do Nascimento, 2011). Daneben werden sie aber auch in den Blutstrom abgegeben und reichern sich in der Niere an, wo sie zur Exkretion von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> führen (Steinbrecher *et al.*, 2001; Sindic & Schlatter, 2005; Moss *et al.*, 2008). Die natriuretischen und diuretischen Effekte von Guanylin und Uroguanylin werden in der Niere durch einen cGMP-abhängigen Mechanismus hervorgerufen, der jedoch nicht von GC-C vermittelt wird.

(Carrithers *et al.*, 2004; Sindic *et al.*, 2005). Daneben gibt es Hinweise auf einen zweiten cGMP-unabhängigen Signalweg, der einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und die Aktivierung von Phospholipase A2 einschließt (Sindice *et al.*, 2002; Sindic *et al.*, 2005).

Aufgrund des 1-3/2-4 Disulfidverbrückungsmusters von Guanylin und Uroguanylin ist bei beiden Peptiden eine Form topologischer Stereoisomerie ausgebildet. Die Peptide kommen in je zwei Konformationen vor: einer aktiven A-Form und einer inaktiven B-Form (Skelton *et al.*, 1994 ; Marx *et al.*, 1998). Die isomere Umlagerung zwischen beiden Formen spielt sich bei Guanylin auf einer Zeitskala von Minuten ab, während sie bei Uroguanylin innerhalb einiger Tage geschieht (Klodt *et al.*, 1997). Die Kinetik dieses Übergangs wird dabei sowohl vom pH als auch von sterischen Einflüssen der Aminosäuren in der Peptidsequenz bestimmt. So wurde bei Uroguanylin beobachtet, dass die Umlagerung bei pH 4,5 wesentlich schneller verläuft als bei pH 7,7 (Marx *et al.*, 1998). Außerdem wurde gezeigt, dass vor allem die Seitenketten von Aminosäuren im C-terminalen Teil von Guanylin und Uroguanylin die jeweiligen Interkonversionskinetiken beeinflussen (Schulz *et al.*, 2005). Die langsamere Umlagerung von Uroguanylin gegenüber Guanylin kann auf eine verstärkte sterische Hinderung durch die zusätzliche C-terminale Aminosäure Leucin zurückgeführt werden (Schulz *et al.*, 1998).

Sowohl Guanylin als auch Uroguanylin sind als 116 bzw. 112 Aminosäuren lange Präprohormone kodiert (de Sauvage *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 1995). Die Hormonsequenzen befinden sich am C-Terminus der jeweiligen Vorläuferproteine. Diese enthalten neben eines aminoterminalen Sekretionssignal (Prä-Sequenz), das während des Exports abgespalten wird, noch eine sog. Prosequenz, die als intramolekulares Chaperon die Faltung und korrekte Disulfidverbrückung der terminalen Hormone ermöglicht (Hidaka *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 1999). Nach der Sekretion der selbst inaktiven Prohormone ins Darmlumen und den Blutstrom werden die Hormone erst dort proteolytisch freigesetzt (Martin *et al.*, 1999). Es ist bisher nicht geklärt, welche Proteasen für die Prozessierung der Prohormone verantwortlich sind. Neben dem 15 Aminosäuren langen Guanylin und dem 16 Aminosäuren langen Uroguanylin (Abb. 1.2) wurden auch längerkettige Fragmente, die die Hormonsequenzen enthalten, isoliert (de Sauvage *et al.*, 1992; Hess *et al.*, 1995).

Die Lösungsstruktur von Proguanylin erklärt die essentielle Rolle, die den Prosequenzen bei der Faltung von Guanylin und Uroguanylin zukommt (Lauber *et al.*, 2003). In Form des Prohormons ist Guanylin durch Wechselwirkungen innerhalb eines zusammen mit dem Aminoterminus gebildeten  $\beta$ -Faltblatts in seiner aktiven Topologie fixiert. Da dabei ein Teil der Hormonoberfläche von der Proregion verdeckt ist, sind die Prohormone selbst nicht bioaktiv (Garcia *et al.*, 1993; Schulz *et al.*, 1999).

## 1.5 Die Humane Rezeptor-Guanylatzyklase C

Als bisher einziger Rezeptor für hitzestabile Enterotoxine wurde die Guanylatzyklase C identifiziert (Schulz *et al.*, 1990; de Sauvage *et al.*, 1991; Vaandrager *et al.*, 1993). Guanylatzyklasen sind in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und der von ihnen aus GTP gebildete *second messenger* cGMP spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler physiologischer Prozesse (Lucas *et al.*, 2000). Man unterscheidet zwischen löslichen Guanylatzyklasen und Transmembranproteinen, die eine intrazelluläre Guanylatzyklase-Domäne besitzen. GC-C gehört zur zweiten Gruppe. Die Familie der membrangebundenen Guanylatzyklasen wurde in erster Linie bei Säugetieren beschrieben, jedoch gibt es auch homologe Vertreter in anderen Wirbeltierklassen (Nakauchi & Suzuki, 2005). Es sind sieben humane Guanylatzyklasen bekannt, die dieser Gruppe zugerechnet werden können und mit GC-A bis GC-G bezeichnet werden. GC-A und GC-B waren die ersten Guanylatzyklasen, die gleichzeitig auch als Rezeptoren für natriuretische Peptidhormone identifiziert wurden (Kuno *et al.*, 1986; Paul *et al.*, 1987; Schulz *et al.*, 1989). Sie sind an der Regulation von Blutdruck, Natrium-Exkretion und Vasodilatation beteiligt.

Im Gegensatz zu GC-A, GC-B und GC-C wurden für die anderen Guanylatzyklasen keine extrazellulären Liganden gefunden. GC-D, GC-E und GC-F werden auch als sensorische Guanylatzyklasen bezeichnet, weil sie an der Regulation der olfaktorischen (GC-D) und visuellen (GC-E und GC-F) Sinneswahrnehmung beteiligt sind (Meyer *et al.*, 2000; Duda & Sharma, 2008). GC-D wird in Geruchssinneszellen exprimiert, während GC-E und GC-F in den Stäbchenzellen der Retina vorkommen (Shyjan *et al.*, 1992; Fulle *et al.*, 1995; Lowe *et al.*, 1995). GC-G wurde u. a. in Nervenzellen nachgewiesen, jedoch ist ihre physiologische Funktion nicht bekannt (Schulz *et al.*, 1998; Fleischer *et al.*, 2009).

### 1.5.1 Regulation der intestinalen Sekretion durch GC-C

GC-C wird sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm exprimiert (de Jonge, 1975; Krause *et al.*, 1994a), jedoch nimmt die Rezeptordichte entlang der longitudinalen Achse des Darms, vom Jejunum bis zum distalen Colon, ab (Krause *et al.*, 1994b). Die gewebespezifische Expression von GC-C wird u. a. von den Transkriptionsfaktoren HNF-4 und Cdx2 reguliert (Swenson *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000).

Zwar zeigen GC-C *knockout* Mäuse keinerlei Krankheitssymptome, jedoch kann bei ihnen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keinerlei STa-induzierte Sekretionsantwort beobachtet werden (Mann *et al.*, 1997; Charney *et al.*, 2001).



*al.*, 2001). Daneben inhibiert cGMP die cAMP-Hydrolyse durch Phosphodiesterase PDE3 (Vaandrager *et al.*, 2000; O'Grady *et al.*, 2002), so dass es zusammen mit cGMP auch zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt. cAMP sowie hohe Konzentrationen von cGMP aktivieren die Proteinkinase A, welche ihrerseits CFTR durch Phosphorylierung aktivieren kann (Chao *et al.*, 1994). Außerdem phosphoryliert PKA den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher NHE3, wodurch die Absorption von  $\text{Na}^+$  aus dem Darmlumen gehemmt wird (He & Yun, 2010). Zusätzlich sorgen sowohl cAMP als auch cGMP dafür, dass CFTR aus intrazellulären Vesikeln in die apikale Zellmembran rekrutiert wird (Tousson *et al.*, 1996; Golin-Bisello *et al.*, 2005).

Der hier vorgestellte Mechanismus der STa-induzierten intestinalen Sekretionsantwort wurde durch eine Vielzahl von Beobachtungen bestätigt und gilt als weithin anerkannt. Zusätzlich wurden einige dazu komplementäre physiologische Effekte von STa identifiziert, die ebenfalls zu einer verstärkten Wassersekretion durch das Darmepithel führen. Dabei ist nicht bekannt, ob diese Wirkungen durch GC-C vermittelt werden und auch von den Hormonen Guanylin und Uroguanylin hervorgerufen werden. So führt STa durch eine Umverteilung von F-Actin zu einer regional begrenzten Umorganisation des Cytoskeletts und damit zu einer Aktivierung von Ionentransportern wie dem  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Austauscher (Matthews *et al.*, 1993). Außerdem wurde gezeigt, dass STa eine verstärkte Sekretion von Neurotransmittern durch enteroendokrine Zellen bewirkt. Diese aktivieren afferente Neuronen, welche wiederum zu einer Stimulierung sekretorischer Nervenzellen der Darmschleimhaut führen (Nzegwu & Levin, 1996; Camilleri *et al.*, 2012). Schließlich wurde sowohl für *E. coli* STa als auch das stark homologe hitzestabile Enterotoxin aus *Y. enterocolitica* eine Aktivierung von Phospholipase  $\text{C}\gamma$  beobachtet (Banik & Ganguly, 1989; Saha *et al.*, 2005). Phospholipase C hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat und setzt dabei die *second messenger* Inositol-1,4,5-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) frei.  $\text{IP}_3$  führt zu einer Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und damit einer Aktivierung von Calmodulin während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (Goyal *et al.*, 1987). PKC sowie Calmodulin-abhängige Proteinkinasen können, ebenso wie PKG II und PKA, durch Phosphorylierung von CFTR und NHE3 die Netto-Sekretion von Ionen stimulieren (Picciotto *et al.*, 1992). Es ist jedoch nicht bekannt, wie genau Phospholipase C von STa aktiviert wird. Für Phospholipase  $\text{C}\gamma$  wurde eine Aktivierung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen beschrieben (Kurosaki & Hikida, 2009). Zwar enthält GC-C eine zu Tyrosin-Kinasen homologe Domäne, jedoch ist diese katalytisch inaktiv (siehe Kap. 1.5.2).

Durch Experimente mit GC-C *knockout* Mäusen wurde nachgewiesen, dass GC-C auch an der Regulation des pH-Werts im Darm beteiligt ist. Demnach wird die säureinduzierte Bicarbonat-Sekretion im Darm durch einen GC-C-abhängigen Mechanismus vermittelt (Rao *et al.*, 2004). Zwar

transportiert CFTR neben  $\text{Cl}^-$  auch  $\text{HCO}_3^-$  ins Darmlumen, jedoch wurde noch ein zusätzlicher STa-stimulierter aber GC-C- und CFTR-unabhängiger Mechanismus der Bicarbonat-Sekretion identifiziert (Sellers *et al.*, 2005; Sellers *et al.*, 2008). Dies deutet auf die schon in älteren Studien postulierte Existenz eines alternativen STa-Rezeptors, der nicht mit GC-C identisch ist, hin (Hirayama *et al.*, 1992; Hugues *et al.*, 1992; Sindice *et al.*, 2002; Carrithers *et al.*, 2004).

### 1.5.2 Die Domänenstruktur von GC-C

GC-C hat mit den anderen Vertretern der Familie der partikulären Guanylatzyklen eine charakteristische Domänenstruktur gemein (Abb. 1.5). Das 1050 Aminosäuren große Protein untergliedert sich in eine extrazelluläre Domäne (406 AS), eine einzelne Transmembranhelix, eine Kinase-Homologie-Domäne (260 AS), eine Dimerisierungsdomäne (43 AS), eine katalytische Guanylatzyklase Domäne (130 AS) sowie eine C-terminale Domäne (63 AS).

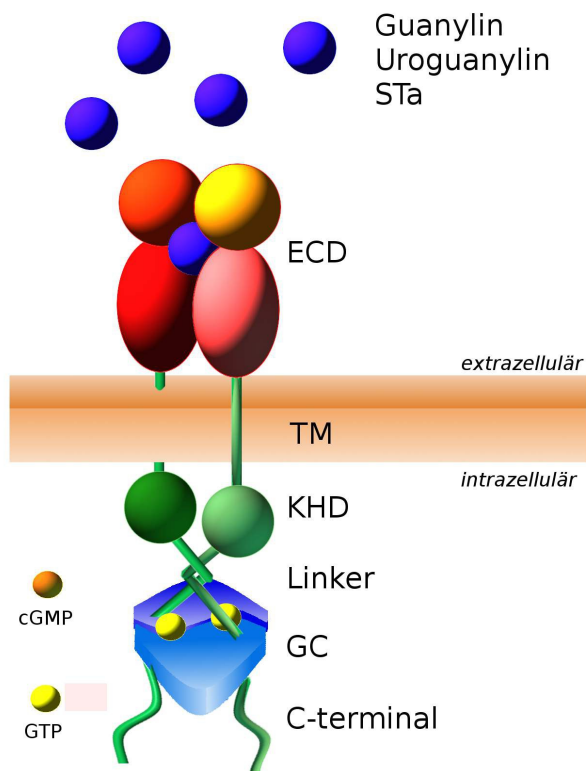


Abb. 1.5: Dimerisierung und Domänenstruktur von GC-C (schematisch). ECD: extrazelluläre Domäne; TM: Transmembrandomäne; KHD: Kinase-Homologie-Domäne; Linker: Linkerregion mit Dimerisierungsmotiv; GC: katalytische Domäne; C-terminal: Carboxy-terminale Region.

#### Extrazelluläre Domäne

Die Extrazelluläre Domäne (ECD) ist die Region, die innerhalb der membrangebundenen Guanylatzyklen die geringste Homologie aufweist. So beträgt beispielsweise die Sequenzidentität



der Extrazellulären Domänen von GC-C und GC-A lediglich 17 % (Hasegawa *et al.*, 2005). Die ECD von GC-C ist 406 Aminosäuren groß, enthält vier Disulfidbrücken sowie 8-10 potentielle N-Glykosylierungsstellen (Vaandrager *et al.*, 1993). Ihre wichtigste Funktion besteht in der Bindung der extrazellulären Liganden Guanylin, Uroguanylin und STa. Es konnte kein direkter Einfluss der N-Glykane auf die Ligandenbindung der ECD nachgewiesen werden (Ghanekar *et al.*, 2004). Jedoch wurde gezeigt, dass Mutanten der ECD, bei denen Glykosylierungsstellen eliminiert wurden, eine geringere Stabilität und eine deutlich geringere Ligandenbindungskapazität aufweisen (Hasegawa *et al.*, 1999b). Zwar ist die Struktur der ECD von GC-C bis zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt, jedoch existieren Kristallstrukturen der ECD von GC-A in Abwesenheit und Gegenwart des Liganden ANP (van den Akker *et al.*, 2000b; van den Akker, 2001; Ogawa *et al.*, 2004). In beiden Strukturen liegt die ECD von GC-A als Dimer vor. Dies ist im Einklang mit früheren Beobachtungen, wonach die ECD von GC-A zur Dimerisierung ausreicht (Chinkers & Wilson, 1992) und diese Dimerisierung unabhängig von der Gegenwart von Liganden ist (Lowe, 1992). Auch für GC-C wurde eine Liganden-unabhängige Dimerbildung der ECD nachgewiesen (Hirayama *et al.*, 1993).

### *Kinase Homologie Domäne*

Der intrazelluläre Teil von GC-C, der proximal zur Membran liegt, weist große Sequenzhomologie mit Tyrosin-Kinasen auf und wird deswegen als Kinase Homologie Domäne (KHD) bezeichnet. Jedoch ist die KHD katalytisch inaktiv und hat in erster Linie regulatorische Funktionen, da ein in katalytisch aktiven Proteinkinasen essentielles HRD-Motiv in der KHD fehlt (Hanks *et al.*, 1995). Phylogenetische Studien konnten zeigen, dass die KHD, die Dimersierungsdomäne und die katalytische GC Domäne evolutionär gemeinsam entstanden sind (Biswas *et al.*, 2009). Die KHD übt einen inhibierenden Einfluss auf die katalytische Domäne aus, der erst durch die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne aufgehoben wird (Koller *et al.*, 1992; Rudner *et al.*, 1995). Die allosterische Bindung von ATP an die KHD ist wichtig für die Aktivierung von Guanylatzyklasen durch extrazelluläre Liganden. Für GC-A wurde besonders ausführlich beschrieben, dass zusätzlich zur Bindung eines natriuretischen Peptids an die extrazelluläre Domäne auch ATP als intrazellulärer Ligand an ein ATP-reguliertes Modul innerhalb der KHD binden muss, um das Signal bis zur katalytischen Domäne weiterzuleiten (Chinkers *et al.*, 1991; Duda *et al.*, 1993; Duda *et al.*, 2001; Duda & Sharma, 2005). Bei GC-C wurde in Abwesenheit von ATP eine schnelle Inaktivierung der katalytischen Domäne nach STa-Bindung beobachtet (Vaandrager *et al.*, 1993; Bakre *et al.*, 2000) und Lys-516 als essentiell für die ATP-Bindung identifiziert (Bhandari *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu GC-A wurde bei GC-C keine Phosphorylierung der KHD beobachtet

(Potter & Hunter, 1998; Ghanekar *et al.*, 2003).

#### *Dimerisierungsdomäne*

Ähnlich wie GC-A bildet auch GC-C Homooligomere in der Membran (Rudner *et al.*, 1995; Thompson & Garbers, 1995). Für die isolierten extrazellulären Domänen wurde eine Dimerbildung nachgewiesen. Zusätzlich wurde die intrazelluläre Region zwischen KHD und GC als Dimerisierungsdomäne identifiziert (Wilson & Chinkers, 1995). Basierend auf ihrer Sequenz wird für das Dimerisierungsmotiv eine *Coiled-Coil*-Struktur angenommen welche die Wechselwirkung der beiden Partner vermittelt. Bei heterolog in HEK293 und Insektenzellen exprimiertem GC-C wurden sowohl für isolierte extrazelluläre als auch für isolierte intrazelluläre Domänen Homotrimere detektiert (Vaandrager *et al.*, 1994; Hasegawa *et al.*, 1999c; Vijayachandra *et al.*, 2000) wobei die Trimerisierung der extrazellulären Domäne ligandenabhängig zu sein scheint. Aufgrund der ungeklärten Rolle der beobachteten Trimerisierung ist der native Assoziationsgrad von GC-C sowie die relativen Beiträge der intra- und extrazellulären Domänen umstritten.

#### *Katalytische Domäne*

Die katalytische Domäne von GC-C ist der Teil des Proteins, der am stärksten innerhalb der Familie der partikulären Guanylatzyklasen konserviert ist. Sie weist zudem eine ausgeprägte Homologie zu den katalytischen Domänen löslicher Guanylatzyklasen und Adenylatzyklasen aus Säugetieren auf. Ebenso wie diese gehört GC-C zur Klasse III der Purin-Nukleotidylzyklasen (Kamenetsky *et al.*, 2006). Wie bei löslichen Guanylatzyklasen ist auch bei membrangebundenen Guanylatzyklasen eine Dimerisierung nötig, um ein katalytisches Zentrum zu bilden. Dabei sind Aminosäuren beider Untereinheiten am Aufbau des katalytischen Zentrums beteiligt (Thorpe & Garbers, 1989; Krupinski *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu den löslichen Guanylatzyklasen, die Heterodimere mit nur einem katalytischen Zentrum bilden (Kamisaki *et al.*, 1986; Harteneck *et al.*, 1990), sind partikuläre Guanylatzyklasen homodimer aufgebaut und enthalten zwei katalytische Zentren (Chrisman *et al.*, 1975; Wong *et al.*, 1995).

#### *Carboxy-terminale Region*

GC-C sowie die sensorischen Guanylatzyklasen D bis F enthalten eine unstrukturierte C-terminale Region, die nicht in GC-A, GC-B oder GC-G vorkommt (Lucas *et al.*, 2000). Zwar ist die genaue Funktion dieser 63 Aminosäuren langen Region bislang nicht eindeutig geklärt, jedoch werden ihr eine Reihe von regulatorischen Wechselwirkungen zugeordnet. So wurde gezeigt, dass Ser-1029 von Proteinkinase C phosphoryliert wird und dass es ohne diese Phosphorylierung nicht zu einer STa-abhängigen Aktivierung der cGMP-Produktion kommen kann (Wada *et al.*, 1996). Außerdem

wurde in der C-terminalen Region eine Signalsequenz identifiziert, die essentiell für die apikale Lokalisierung von GC-C in polarisierten Epithelzellen ist (Hodson *et al.*, 2006). Schließlich wurde der C-Terminus von GC-C als Bindungsstelle des PDZ-Proteins NHERF4 identifiziert. Zwar ist die Rolle der Interaktion zwischen NHERF4 und GC-C nicht bekannt, jedoch wurde gezeigt, dass die Coexpression von NHERF4 zu einer Inhibierung STa-abhängiger cGMP Synthese führt (Scott *et al.*, 2002; Thelin *et al.*, 2005).

### 1.5.3 MiniGC-C

Basierend auf der Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von GC-A (van den Akker *et al.*, 2000a) kann ein dreidimensionales Homologiemodell der ECD von GC-C erstellt werden (Hasegawa *et al.*, 2005). Dieses Homologiemodell besteht, im Einklang mit Sekundärstrukturvorhersagen für GC-C, aus einer membrandistalen  $\alpha/\beta$ -Subdomäne und einer membranproximalen  $\beta$ -reichen Subdomäne (Abb. 1.6).

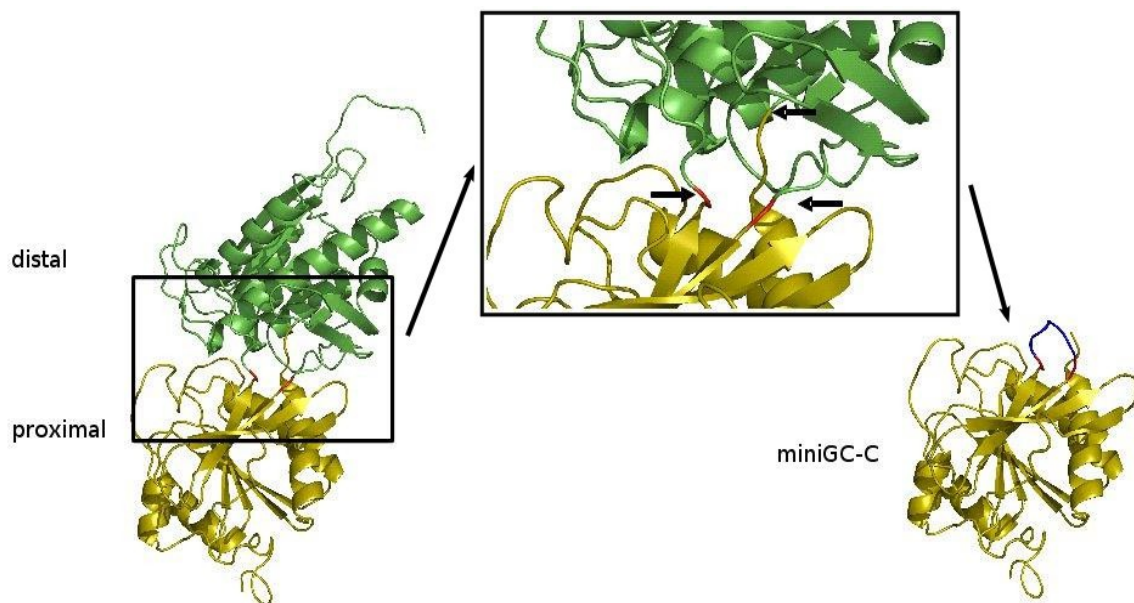


Abb. 1.6: Homologie-Modell der ECD von GC-C und Modell der isolierten membranproximalen Domäne, MiniGC-C. Schwarze Pfeile zeigen Klonierungsoperationen an, die eingefügte Linkerregion ist blau dargestellt.

Durch Photoaffinitätsmarkierung wurde ein Sequenzbereich identifiziert, der an der

Ligandenbindung direkt beteiligt ist. Dabei handelt es sich um die Region von Ser-387 bis Lys-393, die innerhalb der membranproximalen Domäne liegt (Hasegawa *et al.*, 1999a). Um zu testen, ob sich die membranproximale Domäne selbstständig faltet und für die Ligandenbindung ausreichend ist, wurde anhand des ECD-Modells ein Konstrukt entwickelt, welches aus einer Peptidkette besteht und einer isolierten membranproximalen Domäne entspricht (Abb. 1.6) (Lauber *et al.*, 2009).

## **1.6 STa- und Uroguanylin-Analoga als Wirkstoffe zur Behandlung chronischer Verstopfung und des Reizdarmsyndroms**

Aufgrund ihrer Fähigkeit, die intestinale Sekretion anzuregen und damit die Fluidität des Darminhalts zu erhöhen, gelten Agonisten von GC-C als vielversprechende Therapeutika zur Behandlung von Darmerkrankungen wie chronischer Verstopfung (*chronic constipation*, CC) und Obstipations-prädominantem Reizdarmsyndrom (*constipation-predominant irritable bowel syndrome*, IBS-C). Beide Erkrankungen sind weitverbreitet in entwickelten Ländern (Saito *et al.*, 2002; Higgins & Johanson, 2004; Andrews *et al.*, 2005), verursachen signifikante Kosten für Wirtschaft und Gesundheitssysteme (Longstreth *et al.*, 2003; Leong *et al.*, 2003) und stellen für Betroffene eine schwerwiegende Einschränkung der Lebensqualität dar (Damon *et al.*, 2004). Verfügbare Therapeutika beschränken sich auf die Milderung von Symptomen der Erkrankungen, da bisher keine Wirkstoffe zur Behandlung der zugrundeliegenden physiologischen Fehlfunktion bekannt waren (Damon *et al.*, 2004).

Agonisten von GC-C könnten an dieser Stelle Abhilfe schaffen. Mit Linaclotide und Plecanatide befinden sich bereits Analoga von STh und Uroguanylin in klinischen Studien zur Behandlung von IBS-C und chronischer Verstopfung (Abb. 1.7). Linaclotide ist ein 14 Aminosäuren langes Peptid, welches von STa abgeleitet ist und ebenfalls drei intramolekulare Disulfidbrücken besitzt. Der Wirkstoff entspricht in seiner Struktur der toxischen Domäne von STh, wobei Leu-9 (in STh) durch Tyrosin ausgetauscht ist (Busby *et al.*, 2010).

In den USA wurde Linaclotide 2012 unter dem Handelsnamen Linzess für die Behandlung von IBS-C und CC zugelassen<sup>1</sup>. In klinischen Studien konnte eine signifikante, dosis-abhängige Wirkung auf die Transitrate des Darminhalts ohne schwerwiegende Nebeneffekte nachgewiesen werden (Andresen *et al.*, 2007; Lembo *et al.*, 2010; Lembo *et al.*, 2011). Es wird oral aufgenommen und erhöht die Wassersekretion im Darm durch Aktivierung von GC-C (Bryant *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde eine durch Linaclotide vermittelte Senkung der Schmerzempfindlichkeit in

---

<sup>1</sup> FDA approves Linzess to treat certain cases of irritable bowel syndrome and constipation  
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm317505.htm> (Stand: 06.09.2013)

mehreren Tiermodellen für Eingeweideschmerzen beschrieben (Eutamene *et al.*, 2010; Bharucha & Linden, 2010). Diese Effekte werden von GC-C vermittelt und hängen vermutlich mit der in Kap. 1.5.1 beschriebenen Wirkung von STa auf das enterische Nervensystem zusammen.

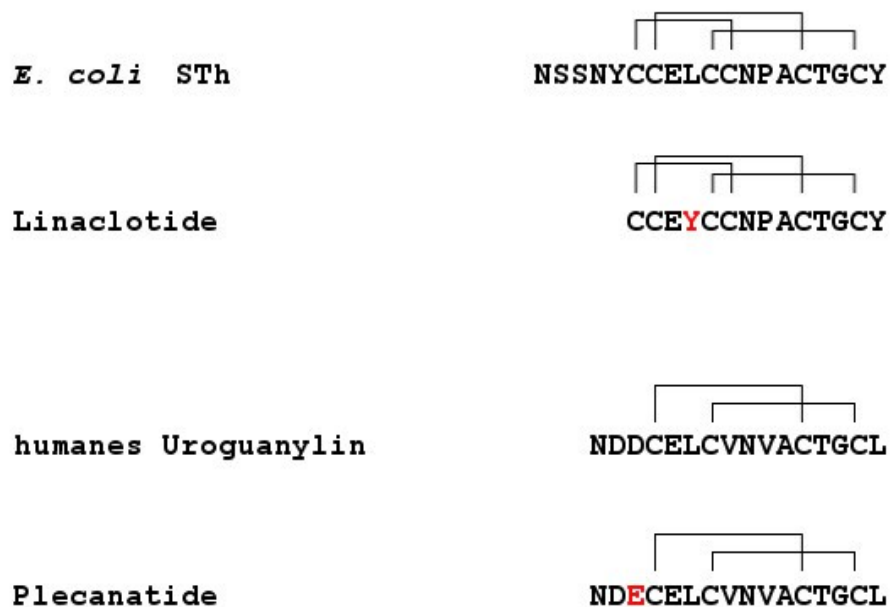


Abb. 1.7: Sequenzvergleich zwischen E. coli STh und dem synthetischen Analogon Linacotide sowie zwischen humanem Uroguanylin und dem Analogon Plecanatide. Disulfidbrücken sind durch Klammern angedeutet.

Ein weiterer Wirkstoff zur Behandlung von chronischer Verstopfung und Reizdarmsyndrom ist Plecanatide, ein synthetisches Uroguanylin-Analogon, das sich mittlerweile in klinischen Tests zur Behandlung von IBS-C (Phase IIb) und CC (Phase IIb/III) befindet<sup>2</sup> (Synergy Pharmaceuticals, Inc. 2013; Shailubhai *et al.*, 2013). Durch Austausch von Asp-3 zu Glutamat wurde die Aktivität des Peptids erhöht und die aktive topologische Konformation begünstigt (Liu *et al.*, 2009). Sowohl Linacotide als auch Plecanatide sind relativ stabil gegenüber Proteasen und extremen pH-Bedingungen, was sie zu idealen, oral applizierbaren Wirkstoffen macht.

<sup>2</sup> <http://www.synergypharma.com/pipeline/clinical-trials> (Stand: 06.09.2013)

## 1.7 Agonisten von GC-C als Diagnostika und Therapeutika für kolorektale Karzinome

Vergleicht man das weltweite Auftreten von Darmkrebs und enterotoxischen Infektionen miteinander, so ergibt sich eine interessante, bis vor kurzem aber kaum beachtete, inverse epidemiologische Beziehung. In Ländern, in denen häufig enterotoxische Infektionen auftreten, ist das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, deutlich verringert (Pitari *et al.*, 2003). Eine Reihe von Beobachtungen bringen dieses geographische Ungleichgewicht mit einer bisher nicht erkannten Rolle von GC-C bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung in Darmepithelzellen in Verbindung. So wurde gezeigt, dass in GC-C-defizienten Mäusen kolorektale Tumore gehäuft auftreten und dass dies durch einen Verlust genomischer Integrität sowie der beschleunigten Proliferation der Enterozyten und dem Fehlen kompensatorischer Apoptose erklärt werden kann (Li *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2010a). Zwar wird GC-C weiterhin von kolorektalen Adenomazellen exprimiert (Shailubhai *et al.*, 2000; Witek *et al.*, 2005), jedoch gehören Guanylin und Uroguanylin zu den Genprodukten, deren Expression bei Darmkrebs am häufigsten verlorengeht (Birkenkamp-Demtroder *et al.*, 2002; Steinbrecher *et al.*, 2002). Da der Verlust der Guanylinpeptide in den frühen Stadien der Krebsentwicklung erfolgt, wurde ein neues pathophysiologisches Paradigma formuliert, nachdem die Karzinogenese im Darm als Folge eines Mangels parakriner Hormone einsetzt (Li *et al.*, 2008). Der hier aufgezeigte Zusammenhang zwischen GC-C-vermittelten Signalwegen und der intestinalen Karzinogenese eröffnete mehrere potentielle Ansätze zur Diagnostik und Therapie von Darmkrebs, die im Folgenden kurz diskutiert werden.

Da GC-C von nahezu allen Arten primärer und metastatischer Kolorektalkarzinomazellen exprimiert wird (Carrithers *et al.*, 1994; Carrithers *et al.*, 1996) und gleichzeitig in Geweben außerhalb des Darmtrakts kaum zu finden ist, gilt GC-C als überaus vielversprechender genetischer und immunohistochemischer Marker für metastatischen Darmkrebs (Cagir *et al.*, 1999; Buc *et al.*, 2005; Birbe *et al.*, 2005) sowie als mögliches Ziel für dessen Immuntherapie (Snook *et al.*, 2008). Mit Methoden, die auf dem Nachweis der GC-C mRNA durch Reverse Transkriptase-PCR basieren, konnten selbst Micrometastasen mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden (Schulz *et al.*, 2006; Waldman *et al.*, 2009).

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur selektiven Bindung an GC-C gelten STh und die Guanylin-Peptide als vielversprechende Leitstrukturen zur Synthese molekularer Sonden, die bei Bildgebungsverfahren zur hochsensitiven Krebs-Diagnostik Anwendung finden (Wolfe *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2009). Radionuklid-markierte Analoga von STh und Uroguanylin wurden im Hinblick auf ihren möglichen Einsatz zur computer-tomographischen Detektion von Darmkrebs entwickelt und in ersten Studien

mit Erfolg eingesetzt (Gali *et al.*, 2002; Giblin *et al.*, 2006b; Giblin *et al.*, 2006c). Von STh abgeleitete Liganden eignen sich auch zur Detektion einiger Brustkrebsarten, da STh auch an einen bisher nicht identifizierten, von GC-C verschiedenen Rezeptor auf der Oberfläche von Brustkrebszellen bindet (Giblin *et al.*, 2006a).

Die durch den Verlust von Guanylin und Uroguanylin erfolgte Inaktivierung des GC-C-Signalwegs kann *in vitro* durch Zugabe von Uroguanylin kompensiert und die Tumorgenese gehemmt werden (Shailubhai *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Beobachtung gilt GC-C als wichtiges therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Darmkrebs und der Einsatz von GC-C Agonisten als Hormonersatztherapie zur Prävention von Metastasenbildung wird diskutiert (Carrithers, 2003; Li *et al.*, 2008).

Die Beobachtung, dass STa bei Darmkrebszellen zu einer cGMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zytostase führt (Pitari *et al.*, 2003; Pitari *et al.*, 2008) deutet auf eine wichtige regulatorische Rolle von GC-C bei Proliferation und Differenzierung von Darmepithelzellen hin. GC-C ist an der Regulation des Zellzyklus in Enterozyten beteiligt und verlangsamt durch die Bildung von cGMP den G1/S-Übergang, der für die Gewährleistung genomischer Integrität durch DNA-Reparaturmechanismen von besonderer Bedeutung ist (Pitari *et al.*, 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass der Verlust des GC-C-Signalwegs zu einer verminderten Apoptose-Rate und einer verstärkten Proliferation von intestinalen Epithelzellen als Antwort auf induzierte Gewebeschäden führt (Steinbrecher *et al.*, 2011).

Ein weiterer möglicher Therapie-Ansatz für Darmkrebs besteht in der Verwendung von hitzestabilem Enterotoxin als Vehikel zum Transport von antikanzerogenen oder kanzerostatischen Wirkstoffen zu Krebszellen (Urbanski *et al.*, 1995; Buc *et al.*, 2005). Da STa von humanen Kolorektalkarzinomazellen internalisiert, wird könnten daran gekoppelte Therapeutika selektiv und hochspezifisch an den Ort der gewünschten Wirkung gebracht werden.

## 2 Zielsetzung

Die intestinale Guanylatzyklase C und ihre endogenen Peptidliganden sind die zentralen Regulatoren des Elektrolyt- und Wasserhaushalts im Darm. Die Bedeutung der Wechselwirkung zwischen der extrazellulären Domäne von GC-C und dem bakteriellen Enterotoxin STh für die Pathogenizität enterotoxischer *E. coli* Stämme ist der Grund dafür, dass beide Bindungspartner Gegenstand intensiver Forschung sind. Seit der erstmaligen Charakterisierung von GC-C und ihrer Liganden wurden viele Erkenntnisse über den physiologischen und regulatorischen Kontext des Systems gewonnen, jedoch fehlt es bis heute insbesondere an einem genauen Verständnis der molekularen Grundlagen dieser Interaktion sowie des Mechanismus, durch den die extrazelluläre Ligandenbindung in eine Aktivierung der intrazellulären katalytischen Domäne übersetzt wird.

Ein wesentlicher Grund für diesen Mangel an strukturellen Informationen besteht in der Schwierigkeit, sowohl GC-C als auch seine Peptidliganden in für strukturelle Untersuchungen ausreichender Menge und Reinheit zu präparieren. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung einer geeigneten rekombinanten Expressions- und Reinigungsstrategie für Peptidliganden von GC-C. Insbesondere sollten das endogene Hormon Uroguanylin und das exogene Enterotoxin STh sowie von diesen beiden Liganden abgeleitete Peptide in *E. coli* exprimiert werden. Das entwickelte Expressionssystem sollte sich zur Herstellung von für NMR-Spektroskopie ausreichenden Mengen der jeweiligen Peptide eignen und die Möglichkeit zur Anreicherung der Proben mit NMR-aktiven Isotopen bieten. Die biologische Aktivität der so erhaltenen Peptide sollte mit einem geeigneten Test überprüft werden.

Ein zweites Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Expressionssystems für die extrazelluläre Domäne von GC-C. Diese kann als Modellsystem zur strukturellen Untersuchung der Ligandenbindung dienen. Dazu sollten mehrere Strategien zur Expression der gesamten ECD oder ihrer membran-proximalen Subdomäne (MiniGC-C) in *E. coli*, der Hefe *Pichia pastoris* und in Säugerzellkulturen entworfen und daraufhin überprüft werden, ob sie sich zur Herstellung einer gefalteten, löslichen Domäne eignen, die in der Lage ist, die biologischen Liganden zu binden.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Bakterien- und Hefestämme, Säugerzelllinien

Es wurden ausschließlich Bakterienstämme der Spezies *Escherichia coli* und Hefestämme der Spezies *Pichia pastoris* verwendet. Die Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über den Genotyp der verwendeten Stämme.

Tab. 3.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>)</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)
<i>E. coli</i> Top10	<i>F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS<sup>-</sup> mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 λ<sup>-</sup></i>	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> Origami B (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB (Kan<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)</i>	(Derman <i>et al.</i> , 1993; Prinz <i>et al.</i> , 1997)
<i>P. pastoris</i> GS115	<i>his4</i>	(Cregg <i>et al.</i> , 1985)

##### 3.1.1 *E. coli* XL1 Blue und Top10

Die *E. coli* Stämme XL1 Blue und Top10 wurden zur Vermehrung und Gewinnung von Plasmiden verwendet. Beide Stämme besitzen hohe Transformationseffizienzen und eignen sich, aufgrund des Fehlens von Restriktionsenzymen (*hsdRMS<sup>-</sup>* bzw. *hsdR17 (rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup>)*), zur stabilen Vervielfältigung der Fremdplasmide. In beiden Stämmen ist zudem die Integration der Plasmide ins Wirtschromosom unterdrückt (*recA1*).

##### 3.1.2 *E. coli* Origami B (DE3)

*E. coli* Origami B (DE3) ist ein Derivat des Stamms BL21 (DE3) und wurde zur Expression rekombinanter Proteine, die Disulfidbrücken enthalten, verwendet.

Der Stamm enthält den Bakteriophagen DE3, der, von  $\lambda$  abgeleitet und als Prophage ins Bakterienchromosom integriert, die Gene für den Lac-Repressor (*lacI*) und die T7-RNA-Polymerase enthält. Das T7-RNA-Polymerase-Gen steht unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors sowie des lacO-Operators und kann durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert werden. Die induzierte T7-RNA-Polymerase kann anschließend Gene, die unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen, transkribieren.

Im Cytoplasma dieses Stamms herrscht ein oxidatives Milieu, wodurch die Ausbildung von Disulfidbrücken in rekombinanten Proteinen unterstützt wird. Dieses Milieu entsteht aufgrund von inaktivierenden Mutationen in den Genen von Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und Glutathion-Oxidoreduktase (*gor522::Tn10*). Da diese Mutationen durch Antibiotika-Resistenzen gegen Tetracyclin und Kanamycin stabilisiert werden, ist der Stamm kompatibel mit Expressionsplasmiden, die Ampicillin- oder Chloramphenicol-Resistenz vermitteln.

### 3.1.3 *P. pastoris* GS115

GS115 ist abgeleitet vom *P. pastoris* Wildtyp X-33 und enthält eine Mutation im Gen für die Histidinol-Dehydrogenase (*his4*), die den Stamm daran hindert, Histidin zu synthetisieren. Expressionsplasmide von *P. pastoris*, etwa pPIC9K-Derivate, enthalten das *HIS4*-Gen, so dass ihre Selektion durch die Komplementierung der Histidin-Auxotrophie von GS115 erfolgen kann. Positive Transformanten wachsen, im Gegensatz zu nicht transformierten GS115, auf Minimalmedium.

### 3.1.4 T84

T84 (ATCC® Catalog No. CCL-284™) ist eine humane Darmzelllinie, die von einem metastatischem Adenokarzinom aus dem Lungengewebe eines 77 Jahre alten Patienten abgeleitet wurde. Es handelt sich um adhärent wachsende Zellen, die u. a. auch die Rezeptorguanylatzyklase GC-C exprimieren (Dharmasathaphorn *et al.*, 1984).

### 3.1.5 COS-7

Die COS-7 Zelllinie (ATCC® Catalog No. CRL-1651™) ist abgeleitet aus der Niere der

Äthiopischen Grünmeerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Die Zellen exprimieren das T Antigen und zeigen einen adhärenenten Wachstumsphänotyp (Gluzman, 1981).

### 3.1.6 HEK 293T

HEK 293 (ATCC® Catalog No. CRL-11268™) ist eine humane Zelllinie die durch Transformation einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit Teilen des menschlichen Adenovirus 5 hergestellt wurde (Graham *et al.*, 1977). HEK 293T leitet sich davon ab und exprimiert zusätzlich noch das SV40large T Antigen. Dadurch ist in HEK 293T die Replikation von Plasmiden, die den Replikationsursprung von SV40 enthalten, möglich. Die Zelllinie ist vergleichsweise einfach zu kultivieren und eignet sich zur rekombinanten Expression von Proteinen. HEK 293T wachsen adhärent am Boden des Kulturgefäßes.

## 3.2 Plasmide

Tabelle 3.2 zeigt eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten, oder im Rahmen dieser Arbeit neu klonierten, DNA-Konstrukte.

Tab. 3.2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten bzw. konstruierten Plasmide.

Plasmid	Verwendung	Referenz
pET32a	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit T7-Promotor; DNA-Sequenzen für einen N-terminalen Thioredoxin-(Trx) und Hexahistidin-(6xHis) Anhang	Novagen (Madison, USA)
pET43.1a-NusA-C489A	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit T7-Promotor; DNA-Sequenzen für einen N-terminalen NusA-C489A- und Hexahistidin-Anhang	(Tidten, 2003)
pET43.1a-NusA-Cys <sup>-</sup>	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit T7-Promotor; DNA-Sequenzen für einen N-terminalen NusA-C251A-C454A-C489A- und Hexahistidin-Anhang	diese Arbeit
pPIC9K	<i>P. pastoris</i> Expressionsvektor mit AOX1-Promotor; DNA-Sequenzen für das Sekretionssignal des $\alpha$ -Faktors aus <i>S. cerevisiae</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pET32a- Asp-pres-prouroguanylin	pET32a-Derivat; integriert in die MCS ist das Gen für humanes Prouroguanylin mit einer N-terminalen	(Schuster, 2004)

	Spaltstelle für PreScission Protease, vor der die Sequenz für 5 Aspartat-Reste kloniert ist; verwendete Restriktionsenzyme: <i>SacI</i> und <i>EcoRI</i>	
pET32a-Asp-pres-prouro-STh	pET32a-Derivat; integriert in die MCS ist das Gen für humanes Prouro-STh mit einer N-terminalen Spaltstelle für PreScission Protease, vor der die Sequenz für 5 Aspartat-Reste kloniert ist	diese Arbeit
pET32a-Asp-pres-prouro-STh-L78Y	pET32a-Asp-pres-prouro-STh-Derivat; zur Expression von STh L9Y	diese Arbeit
pET32a-Asp-pres-prouro-STh-Y74R-L78Y	pET32a-Asp-pres-prouro-STh-Derivat; zur Expression von STh Y5R L9Y	diese Arbeit
pET32a-Asp-pres-prouroguanylin-A72R-D75E	pET32a-Asp-pres-prouroguanylin-Derivat; zur Expression von Uroguanylin A3R D6E	diese Arbeit
pET32a-Asp-pres-prouroguanylin- $\Delta(70-72)$ -D75E	pET32a-Asp-pres-prouroguanylin-Derivat; zur Expression von Uroguanylin $\Delta_{TIA}$ D6E	diese Arbeit
pET43.1a-NusA-C489A-miniGC-C	pET43.1a-C489A-Derivat; zur Expression von MiniGC-C; kodiert für eine PreScission-Schnittstelle zwischen NusA-C489A und MiniGC-C	diese Arbeit
pET32a-ECD-GC-C	pET32a-Derivat; zur Expression der ECD von humanem GC-C; kodiert für eine PreScission-Schnittstelle zwischen Trx und ECD-GC-C	diese Arbeit
pET43.1a-NusA-Cys <sup>-</sup> -ECD-GC-C	pET43.1a-Derivat; zur Expression der ECD von humanem GC-C; kodiert für eine PreScission-Schnittstelle zwischen NusA-Cys <sup>-</sup> und ECD-GC-C	diese Arbeit
pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis	pPIC9K-Derivat; zur Expression der ECD von humanem GC-C mit einem C-terminalen Hexahistidin-Anhang; verwendetes Restriktionsenzym: <i>XhoI</i>	diese Arbeit
pCMV_Nrxn	Derivat von pCMV5; Expressionsvektor für die transiente Transfektion in Säugerzellen. Kodiert für das Sekretionssignal von Neurexin 1 a sowie in 3'-Position der MCS für die Sequenz des Fc-Fragments von humanem IgG.	(Reissner <i>et al.</i> , 2008)

pCMV_Nrxn_ECD-Thr	Kodiert für die ECD von humanem GC-C als Fusionsprotein mit einem C-terminalen IgG-Anhang. Zwischen ECD-GC-C und IgG befindet sich eine Erkennungssequenz für Thrombin.	diese Arbeit
-------------------	---	--------------

### 3.2.1 pET32a

pET32a ist ein Vektor für die induzierte Überexpression von Fremdgenen in *E. coli* (Abb. 3.1). Die Gene werden als genetische Fusion mit N-terminalem Thioredoxin (Trx) exprimiert. Zwischen Trx und dem Fremdprotein befindet sich außerdem noch eine Hexahistidin-Sequenz zur Reinigung durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie. Trx wirkt als Löslichkeitsanhang und soll die Faltung bzw. spätere Solubilisierung des Fusionspartners aus unlöslichen Proteinaggregaten unterstützen. Das Gen für das Fusionsprotein steht unter der Kontrolle des T7-Promotors und seine Expression kann damit in Bakterienstämmen, die den DE3-Prophagen enthalten, durch IPTG-Zugabe induziert werden.

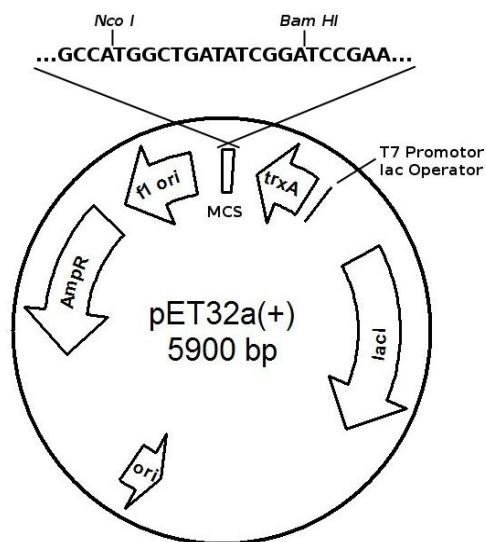


Abb. 3.1: Plasmidkarte von pET32a. Der T7 Promotor steht unter der Kontrolle des lac Operators und reguliert die Expression eines Fusionsproteins, dass aus einem N-terminalen Thioredoxin (trxA), einem 6xHis-Anhang und dem Zielprotein besteht. Der Vektor kodiert zusätzlich noch den Repressor lacI sowie eine Ampicillin-Resistenz (AmpR) für die Selektion. ori: pBR322 Replikationsursprung; f1 ori: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 (für die Produktion einzelsträngiger DNA). Das in dieser Arbeit verwendete Gen für die ECD von GC-C wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme NcoI und BamHI in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) eingefügt.

pET32a wurde zur Expression von von Prouroguanylin, Prouro-STh und deren mutierten Derivaten verwendet. Außerdem wurde in dieser Arbeit die Verwendung von pET32a zur Expression der ECD von GC-C in *E. coli* untersucht.

### 3.2.2 pET43.1a-NusA-C489A und pET43.1a-NusA-Cys<sup>-</sup>

Ein weiterer Expressionsvektor für *E. coli* ist pET43.1a, von dem die beiden in dieser Arbeit verwendeten Vektoren pET43.1a-NusA-C489A und pET43.1a-NusA-Cys<sup>-</sup> abgeleitet sind (Abb. 3.2). Sie kodieren für einen N-terminalen NusA-Löslichkeitsanhang sowie einen Hexahistidin-Reinigungsanhang.

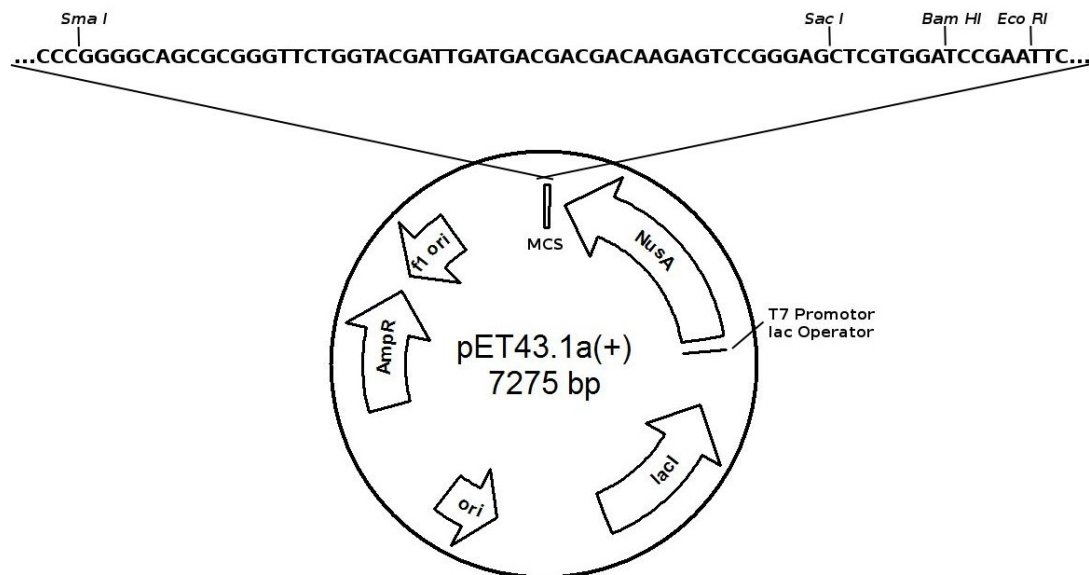


Abb. 3.2: Plasmidkarte von pET43.1a. Wie andere pET-Vektoren auch kodiert pET43.1a für einen T7 Promotor, ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR), den lac Repressor (lacI) und Replikationsursprünge für *E. coli* (ori) und Bakteriophage f1 (f1 ori). Der Einbau des Fremdgens erfolgt hinter den Sequenzen für einen NusA-Löslichkeitsanhang sowie einen Hexahistidinanhang. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei modifizierte Varianten des Vektors verwendet, bei denen das Cystein 489 bzw. die drei Cysteine 251, 454 und 489 in NusA durch Alanine ersetzt wurden. Das Gen für MiniGC-C wurde durch die Restriktionsenzyme SmaI und BamHI in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) eingefügt, während beim Gen für die gesamte ECD von GC-C die Enzyme SacI und EcoRI verwendet wurden.

Auch in diesen Vektoren steht das Fusionsprotein unter der Transkriptionskontrolle des T7-Promotors. Da er zur Expression von Proteinen mit Disulfidbrücken verwendet werden sollte, wurde der ursprüngliche pET43.1a-Vektor so verändert, dass im NusA-Anhang enthaltene Cysteine durch Alanin ersetzt wurden. Dies betrifft Cys-489 im Falle von pET43.1a-NusA-C489A sowie Cys-251, Cys-454 und Cys-489 im Falle von pET43.1a-NusA-Cys<sup>-</sup>. Die Maßnahme diente dazu, zu verhindern, dass sich im oxidativen Cytoplasma von Origami B (DE3) Disulfidbrücken zwischen dem NusA-Anhang und seinen Fusionspartnern bilden. pET43.1A-NusA-C489A wurde zur Expression von MiniGC-C verwendet während pET43.1a-NusA-Cys<sup>-</sup> bei der Expression der ECD von GC-C eingesetzt wurde.

### 3.2.3 pPIC9K

Der Vektor pPIC9K eignet sich zur sekretierten Expression rekombinanter Proteine in *P. pastoris* (Abb. 3.3).

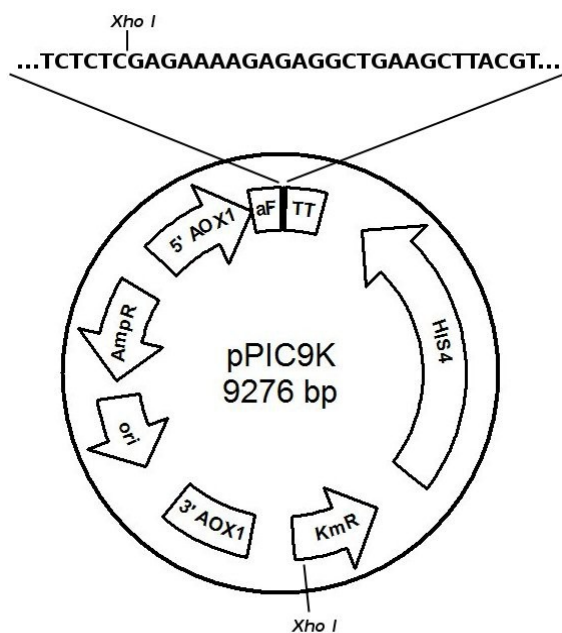


Abb. 3.3: Vektorkarte von pPIC9K. Der Vektor enthält Gene für die Histidinol-Dehydrogenase (HIS4), die zur Synthese von Histidin essentiell ist, sowie zur Vermittlung von Resistenzen gegen Ampicillin (AmpR; in *E. coli*) und Geneticin (KmR; in *P. pastoris*). Das exprimierte Fremdgen steht unter der Kontrolle des Promotors der Hefe-eigenen Alkoholoxidase 1 (5' AOX1). Das Sekretionssignal des  $\alpha$ -Faktors von *S. cerevisiae* (aF) wird zur Sekretion des Zielproteins ins Medium benötigt. Der Vektor wird in linearisierter Form in *P. pastoris* eingeführt und integriert durch homologe Rekombination ins Hefegenom. ori: Replikationsursprung für *E. coli*; TT: Transkriptions-Terminator; 5' AOX1: 5'-Region des AOX1 Promotors; 3' AOX1: 3'-Region des AOX1-Promotors. Das Fremdgen wurde durch XhoI in den Vektor eingeführt. Vorher wurde eine zusätzliche XhoI-Schnittstelle im KmR-Gen des Vektors durch Mutagenese entfernt.

Er enthält den Replikationsursprung von pBR322 sowie ein Ampicillin-Resistenzgen zur Manipulation des Vektors in *E. coli*. Das Gen *HIS4* kodiert für die Histidinol-Dehydrogenase und dient der Selektion positiver Transformanten in *HIS4*-defizienten *P. pastoris* Stämmen. Zusätzlich enthält der Vektor das Kanamycin-Resistenzgen, welches ebenfalls Resistenz gegen das bei Eukaryonten eingesetzte Antibiotikum Geneticin verleiht. Diese Resistenz dient dem *in vivo screening* von Klonen mit Multi-Kopien-Insertionen des Vektors. Das Sekretionssignal des  $\alpha$ -Faktors aus *S. cerevisiae* dient der Sekretion von Zielproteinen und wird in *P. pastoris* während dem Export abgespalten.

Der Vektor wurde in dieser Arbeit zur Expression von GC-C-6xHis verwendet. Das Fremdgen wurde dabei mit dem Restriktionsenzym *XhoI* in die MCS des Vektors inseriert. Vorher wurde eine zweite *XhoI*-Schnittstelle im Kanamycin-Resistenzgen des Vektors durch ortsgerichtete Mutagenese entfernt.

### 3.2.4 pCMV\_Nrxn

pCMV\_Nrxn ist ein Vektor zur Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen (Abb. 3.4).

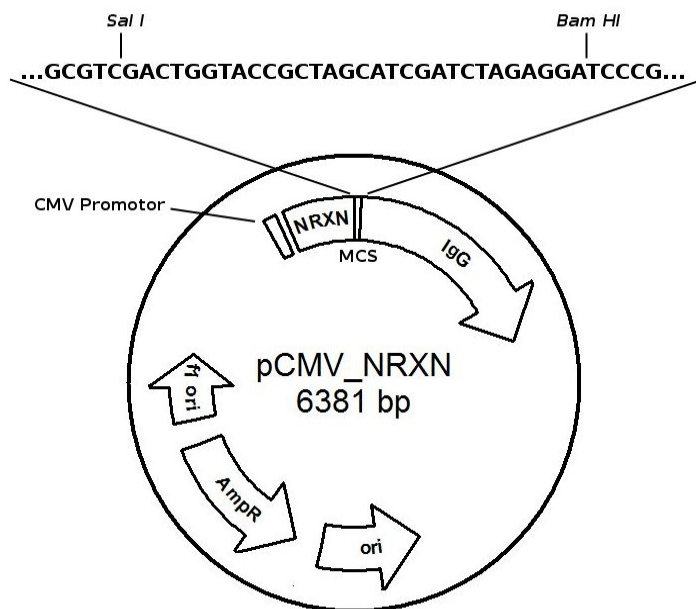


Abb. 3.4: Vektorkarte von pCMV\_Nrxn. Der Vektor enthält das Ampicillin-Resistenzgen (AmpR) zur Stabilisierung in *E. coli*. Außerdem enthält er Replikationsursprünge für *E. coli* (ori) und den Phagen f1 (f1 ori). Der Vektor kodiert für den CMV Promotor und enthält zur Multiplen Klonierungsstelle (MCS) benachbarte Sequenzen, die für ein N-terminales Sekretionssignal (NRXN) sowie für einen C-terminalen IgG-Reinigungsanhang kodieren.

pCMV\_Nrxn ist abgeleitet vom pCMV5 Expressionsvektor (Andersson *et al.*, 1989) und eignet sich zur transienten Transfektion von Säugerzellen. Die Transkription eines in den Vektor klonierten



Zielproteins steht unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus (CMV) Promotors. In 5'-Richtung der Multiplen Klonierungsstelle ist das Sekretionssignalpeptid des synaptischen Membranproteins Neurexin 1a aus *Rattus norvegicus* während sich am 3'-Ende der MCS die Sequenz eines 26,8 kDa IgG-Anhangs befindet. Dieser Anhang dient der späteren Reinigung eines Fusionsproteins durch Affinitätschromatographie mit Protein A Sepharose. Die IgG kodierende Sequenz ist 1296 bp lang und wird nach der Transkription durch Spleißen zum fertigen Transkript prozessiert.

Das Gen der extrazellulären Domäne von GC-C mit einer C-terminalen Thrombin-Erkennungssequenz wurde unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Sall* und *BamHI* in die MCS des Vektors eingefügt.

### 3.3 Oligonukleotide

In Tabelle 3.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Sie wurden von den Firmen biomers.net (Ulm) und IBA GmbH (Göttingen) bezogen.

Tab. 3.3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

#	Sequenz	Länge	Verwendung
1	5'-GCA ACT ATT GCT GCG AAT ATT GCT GCA ACC CGG CGT GC-3'	38 bp	Mutagenese ProuroSTh L78Y, <i>forward</i> Primer
2	5'-GCA CGC CGG GTT GCA GCA ATA TTC GCA GCA ATA GTT GC-3'	38 bp	Mutagenese ProuroSTh L78Y, <i>reverse</i> Primer
3	5'-CCA TCT TCA AAA CCC TGC GTA ACA GCA GTA ACC GTT GCT GCG AAT ATT GC- 3'	50 bp	Mutagenese ProuroSTh L78Y Y74R, <i>forward</i> Primer
4	5'-GCA ATA TTC GCA GCA ACG GTT ACT GCT GTT ACG CAG GGT TTT GAA GAT GG-3'	50 bp	Mutagenese ProuroSTh L78Y Y74R, <i>reverse</i> Primer
5	5'-GTA CCA TCG CTA ACG ACG AAT GCG AAC TGT GC-3'	32 bp	Mutagenese Prouroguanylin D75E, <i>forward</i> Primer
6	5'-GCA CAG TTC GCA TTC GTC GTT AGC GAT GGT AC-3'	32 bp	Mutagenese Prouroguanylin D75E, <i>reverse</i> Primer
7	5'-CCC TGC GTA CCA TCC GTA ACG ACG AAT GCG AAC TGT GCG-3'	39 bp	Mutagenese Prouroguanylin D75E A72R, <i>forward</i> Primer
8	5'-CGC ACA TTG CGC ATT CGT CGT TAC GGA TGG TAC GCA GGG-3'	39 bp	Mutagenese Prouroguanylin D75E A72R, <i>reverse</i> Primer
9	5'-CCA TCT TCA AAA CCC TGC GTA ACG	42 bp	Mutagenese Prouroguanylin D75E

	ACG AAT GCG AAC TGT GCG-3'		$\Delta 70-72$ , <i>forward</i> Primer
10	5'-CGC ACA GTT CGC ATT CGT CGT TAC GCA GGG TTT TGA AGA TGG-3'	42 bp	Mutagenese Prouroguanylin D75E $\Delta 70-72$ , <i>reverse</i> Primer
11	5'-GGGAAACGTCTTGCTCTAGGCCGC GATTAAATTC-3'	34 bp	Mutagenese von pPIC9K, Entfernung der <i>XhoI</i> -Schnittstelle aus <i>HIS4</i>
12	5'-GAATTTAATCGCGGCCTAGAGCAA GACGTTTCCC-3'	34 bp	Mutagenese von pPIC9K, Entfernung der <i>XhoI</i> -Schnittstelle aus <i>HIS4</i>
13	5'-CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGA AGCTAGCCAGGTTAGCCAGAACTG-3'	47 bp	Klonierung von pPIC9K-ECD-GC- C-6xHis, <i>forward</i> Primer
14	5'-CCGCTCGAGTTAGTGGTGGTGGAGGT GGTGCTGCGGGCCACGAACCGGTG-3'	49 bp	Klonierung von pPIC9K-ECD-GC- C-6xHis, <i>reverse</i> Primer
15	5'-GAGCTCAGCACATGGACAGCCCAG ATC-3'	27 bp	Klonierung von pET43.1a-NusA- Cys <sup>-</sup> -ECD-GC-C, <i>forward</i> Primer
16	5'-CTCGAATTCGGATCCGTCGAC-3'	21 bp	Klonierung von pET43.1a-NusA- Cys <sup>-</sup> -ECD-GC-C, <i>reverse</i> Primer
17	5'-ACGCGTCGACTAGCCAGGTTAGCC AGAACTGCC-3'	33 bp	Klonierung von pCMV_Nrxn-ECD- GC-C-Thr, <i>forward</i> Primer
18	5'-CGGGATCCTCGCTGCCTCTGGGCAC CAGCTGCGGGCCACGACCGGTGATATCG- 3'	53 bp	Klonierung von pCMV_Nrxn-ECD- GC-C-Thr, <i>reverse</i> Primer

### 3.4 Nährmedien

Alle Medien wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt und durch Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar Überdruck) sterilisiert. Eine Ausnahme bilden hier die Medien für die Anzucht von Säugerzellen, die steril gekauft und direkt eingesetzt wurden.

Einige hitze-sensitive Bestandteile, etwa Glukose, Antibiotika, MEM-Vitamine oder *Yeast Nitrogen Base* (YNB) wurden sterilfiltriert (0,2 µm Filter, Sartorius, Göttingen) und den autoklavierten Medien nach Abkühlen auf etwa 60 °C zugesetzt. Für die Herstellung von Agarplatten wurde den Bakterienmedien 15 g/l Agar und den Hefemedien 20 g/l Agar zugesetzt.

Die verwendeten Antibiotika-Konzentrationen betragen: 100 µg/ml Ampicillin; 15 µg/ml Kanamycin ; 12,5 µg/ml Tetracyclin.

#### 3.4.1 Nährmedien für *E. coli*

##### LB-Medium (Luria Bertani)

LB-Medium wurde aus 10 g/l tryptischem Pepton, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l NaCl hergestellt.

**M9-Minimalmedium**

M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989) wurde zur Anzucht von Bakterien in definiertem Medium verwendet. Zumeist geschah dies, um exprimierte Proteine mit NMR-aktiven Isotopen, etwa  $^{15}\text{N}$ , zu markieren. Die Basis für die Herstellung des Minimalmediums bilden eine 10fach konzentrierte Stammlösung der M9-Salze sowie eine TS2-Spurenelementlösung (Meyer & Schlegel, 1983).

10 × M9-Salze:	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	171	g/l
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	30	g/l
	$\text{NaCl}$	10	g/l
TS2:	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	100	mg/l
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	30	mg/l
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	300	mg/l
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	200	mg/l
	$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	20	mg/l
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	10	mg/l
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	900	mg/l
	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	20	mg/l

Zur Herstellung von 1 l Minimalmedium wurden 100 ml 10 × M9-Salze in 900 ml Wasser gelöst und autoklaviert. Dieser Lösung wurden 2,0 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$ , 2,0 ml TS2-Lösung, 1,0 ml 10 mM Fe(III)-citrat, 30 ml 20 % (w/v) Glukose, 1,5 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100 µl 1 M  $\text{CaCl}_2$ , 10 ml 100x MEM-Vitaminlösung sowie Antibiotika zugesetzt. Im Falle der Isotopenmarkierung rekombinanter Proteine wurde  $^{15}\text{N}$ -( $\text{NH}_4$ ) $_2\text{SO}_4$  eingesetzt.

**3.4.2 Nährmedien für *P. pastoris***

Zur Herstellung der Nährmedien für Hefekulturen wurden die Chemikalien Difco YNB (engl.: *Yeast Nitrogen Base*, ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat, BD, Sparks, MD, USA), Biotin (Sigma-Aldrich, Steinheim) und Geneticin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) benötigt. Diese wurden sterilfiltriert und den Medien nach dem Autoklavieren zugefügt.

**YPD-Medium (Yeast Extract Peptone Dextrose):**

10 g/l	Hefeextrakt
20 g/l	tryptisches Pepton
20 g/l	Glukose

Zur Herstellung von YPD-Agarplatten wurde dem Medium 20 g/l Agar sowie Geneticin in der jeweils gewünschten Konzentration zugesetzt.

**MD- und MM-Medium (Minimal Dextrose bzw. Minimal Methanol):**

3,4 g/l	YNB	
10 g/l	Ammoniumsulfat	
400 µg/l	Biotin	
20 g/l	Glukose	oder
5 g/l	Methanol	

**BMGY- und BMMY-Medium (Buffered Glycerol/Methanol-complex Medium):**

100 mM	Kaliumphosphat, pH 6,0	
10 g/l	Hefeextrakt	
20 g/l	tryptisches Pepton	
3,4 g/l	YNB	
10 g/l	Ammoniumsulfat	
400 µg/l	Biotin	
10 g/l	Glycerol	oder
5 g/l	Methanol	

**Fermentationsmedium:**

100 mM	Kaliumphosphat, pH 6,0
10 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	Caseinhydrolysat
20 g/l	tryptisches Pepton
40 g/l	Glycerol

Durch Zugabe von 14 ml 25 % NH<sub>3</sub> pro Liter Medium wurde der pH-Wert auf etwa 6 eingestellt.

Dem Fermentationsmedium wurde außerdem noch 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt um bakteriellen Infektionen entgegenzuwirken.

**PTM1-Spurenelemente:**

6,0 g/l	CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O
0,08 g/l	NaI
3,0 g/l	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
0,2 g/l	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O
0,02 g/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,5 g/l	CoCl <sub>2</sub>
20,0 g/l	ZnCl <sub>2</sub>
65,0 g/l	FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O
0,2 g/l	Biotin
5,0 ml/l	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Die Salze wurden in Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert. Die 1,2 % (v/v) dieser PTM1-Lösung wurden den während der Fermentation zugefütterten 50 %-Glycerin- bzw. 100 % Methanol-Lösungen zugesetzt.

**3.4.3 Nährmedien und Chemikalien für die Kultur von Säugerzellen**

HEK 293T Zellen wurden in folgenden Medium kultiviert:

- DMEM (PAN Biotech GmbH, Aidenbach)
- + 10 % Fetales Rinderserum (Südamerika, PAN Biotech GmbH, Aidenbach)
- + 1 % Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech GmbH, Aidenbach)

T84 Zellen wurden im folgenden Medium kultiviert:

- DMEM/F12 + GlutaMAX™ (Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- + 5 % Fetales Rinderserum (Südamerika, PAN Biotech GmbH, Aidenbach)
- + 1 % Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech GmbH, Aidenbach)

Für den *in vitro* Aktivitätstest (Kap. 3.21.3) wurde zudem OPTI-MEM® I Medium (Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet. Folgende Chemikalien wurden bei der Subkultur der

Zellen verwendet:

- 0,26 % Trypsin/0,02 % EDTA (PAN Biotech GmbH, Aidenbach)
- Phospat-gepufferte Saline (DPBS, ohne Ca und Mg, PAN Biotech GmbH, Aidenbach)

### 3.5 Enzyme, Proteine, Kits und Standards

#### Protein-Molekulargewichtsstandards:

- low range Proteinstandard (Phosphorylase B: 97,4 kDa; Rinderserumalbumin: 66,2 kDa; Ovalbumin: 45,0 kDa; Carboanhydrase: 31,0 kDa; Trypsininhibitor: 21,5 kDa; Lysozym: 14,4 kDa; Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Precision Plus Protein All Blue Standard (Proteinbanden bei 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa, 200 kDa, 250 kDa; Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

**Restriktionsenzyme:** Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Schwalbach , Taunus) bezogen. Im Einzelnen waren dies:

- *BglII*
- *NcoI*
- *SacI*
- *EcoRI*
- *XhoI*
- *BamHI*
- *SmaI*

**Enzyme:** Vent<sub>R</sub>® DNA-Polymerase, T4 DNA-Ligase und T4 Polynukleotid-Kinase wurden ebenfalls von New England Biolabs (Schwalbach, Taunus) gekauft. Thrombin (Novagen®, Restriction Grade) wurde von EMD Chemicals (San Diego, CA, USA) gekauft. Lysozym wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim) und DNase I wurde von Roche (Mannheim) bezogen. Antarktische Phosphatase (New England Biolabs, Schwalbach , Taunus)

**Kits:**

- für die ortsgerichtete Mutagenese wurde der QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies (Böblingen) verwendet
- für die Präparation von Plasmid-DNA wurde der Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) oder, bei größeren DNA-Mengen, der Nucleobond® AX Midiprep-Kit (Macherey-Nagel, Düren) benutzt
- für die Gelextraktion von DNA wurde der Qiaquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet
- für die Konzentrationsbestimmung von Uroguanylin, STh und ihrer Derivate wurde der PIERCE BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Bonn) benutzt
- für die Bestimmung der cGMP-Konzentration beim *in vitro* Aktivitätstest (Kap. 3.21.3) wurde der cGMP Enzyme Immunoassay Kit, Direct von Sigma-Aldrich (Steinheim) verwendet

**3.6 Sonstige Chemikalien**

[<sup>15</sup>N]-Ammoniumsulfat wurde von Cambridge Isotopes Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA) gekauft. Methanol und Ethanol wurden von VWR International GmbH (Darmstadt) bestellt. Proteaseinhibitor-Cocktail EDTA-free wurde von Roche (Mannheim) bezogen. Rotiphorese® Lösungen A und B, Pepton, Hefeextrakt, Imidazol, Ampicillin, Kanamycinsulfat, Dithiotreitol, L-Glutathion, Tetracyclin-Hydrochlorid, Agarose, Agar und 4x Roti-Load® Probenpuffer wurden von Roth (Karlsruhe) bestellt. N-,N-,N',N'-Tetramethylethylendiamin wurde von Serva (Heidelberg) gekauft. Brij® 35 wurde von Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) und Antifoam-Y30 von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Alle Chemikalien, deren Herkunft in dieser Arbeit nicht näher spezifiziert ist, wurden von Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

**3.7 Sonstige Materialien**

Säulen für die FPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg):

- HisTrap™ HP, 5 ml

- HiTrap™ Chelating HP, 5 ml
- GStap™ HP, 5 ml
- HiTrap™ QXL, 5 ml
- HiTrap™ SPXL, 5 ml
- HiPrep™ IMAC FF 16/10, 20 ml
- Superdex™ 75
- Superdex™ 200 10/300 GL

Säule für die RP-HPLC (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, *ehemals Amersham Biosciences*):

- Resource™ RPC, 3 ml

Verschiedenes:

- Spectra/Por-Dialyseschläuche, 100 Da, 1000 Da, 3500 Da und 10000 Da Molekulargewichts-Ausschlussgrenze (Roth, Karlsruhe)
- Vivaspin® 20, Molekulargewichts-Ausschlussgrenzen 5000 Da und 10000 Da (Sartorius AG, Göttingen)
- Cellstar® Zellkulturflaschen aus Polystyrol, 75 cm<sup>2</sup> (250 ml) und 25 cm<sup>2</sup> (50 ml), mit Filterdeckel (Greiner Bio-One, Solingen)
- rmp Protein A Sepharose FF (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)

Geräte: eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte befindet sich im Anhang (siehe Kap. 10.4).

### 3.8 Bestimmung der Zelldichte von Bakterien und Hefen

Photometrische Messungen wurden an einem Ultrospec™ 2100Pro Photometer (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, *ehemals Amersham Biosciences*) durchgeführt. Die Lichtstreuung von Bakterien- oder Hefe-Suspensionen bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) wurden in 1 cm Polystyrol-Halbmikroküvetten (Roth, Karlsruhe) gemessen, wobei als Referenz die jeweiligen reinen Nährlösungen verwendet wurden. Bei *E. coli* Kulturen entspricht eine OD<sub>600</sub> von 1 etwa einer Zelldichte von  $1 \times 10^9$  Zellen pro ml. Bei *P. pastoris* entspricht 1 OD<sub>600</sub> etwa einer Dichte von  $5 \times 10^7$  Zellen pro ml.



Da Hefekulturen generell wesentlich höhere optische Dichten bei 600 nm aufweisen als Bakterienkulturen, wurde die Zelldichte von Hefekulturen in der Regel in Form des Nasszellgewichts in 1 ml der jeweiligen abzentrifugierten Zellsuspension angegeben.

### 3.9 Konzentration von Proteinen

Die Konzentration von größeren, Tryptophan-haltigen Proteinen wurde durch die photometrische Bestimmung ihrer Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Proteinlösungen wurden geeignet verdünnt und in einer 1 cm Quarzküvette mit Hilfe eines Ultrospec™ 2100Pro Photometers (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, *ehemals Amersham Biosciences*) vermessen.

Zur Konzentrationsbestimmung von Peptiden, wie etwa Uroguanylin, STh und deren mutierten Varianten, wurde der PIERCE BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Bonn) verwendet. Die Methode basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der, im alkalischen Milieu,  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch die Peptidbindungen von Proteinen zu  $\text{Cu}^+$  reduziert werden. Bicinchoninsäure (BCA) bildet mit diesen Ionen einen farbigen Komplex, der dem sensitiven kolorimetrischen Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm dient. Da die Reduktion der Kupferionen ein temperaturabhängiger Prozess ist, kann die Konzentration des gebildeten Farbkomplexes und damit die Sensitivität des Nachweises in gewissen Grenzen variiert werden. Als Referenz wurden Rinderserumalbumin-Lösungen mit definierten Konzentrationen verwendet.

### 3.10 Gelelektrophorese

#### 3.10.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Kontrolle von Größe und Reinheit von DNA, zumeist handelte es sich dabei um Plasmidpräparationen (Kap. 3.11) oder durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente (Kap. 3.15.4), wurde Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Elektrophorese wurde in MINI-SUB® CELL GT Gelkammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit etwa 10 cm × 6 cm großen Gelen durchgeführt. Zur Herstellung der Gele wurde 0,8 % (w/v) oder 1,5 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer (90 mM Tris/HCl, 90 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2 mM EDTA, pH 8,0) durch Erhitzen gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 60 °C wurden 5 µl 1 % Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml Gel zugegeben.

Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 2/5 Volumen eines Gelauftragspuffers (50 mM

EDTA, 50 % Glycerin (v/v), 0,15 % Bromphenolblau (w/v) und 0,15 % Xylencyanol (w/v)) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 99 V und 65 mA durchgeführt und bei einem Unterschied der Laufstrecken der beiden Farbmarker von etwa 2 cm beendet. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Banden wurden mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (GEL DOC™ 2000 bzw. GEL DOC™ XR+, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) aufgezeichnet. Als DNA-Längenstandard wurden  $\lambda$ Hind III DNA (23,13 kb; 9,415 kb; 6,557 kb; 4,631 kb; 2,322 kb; 2,027 kb; 0,564 kb; 0,125 kb) oder peqGOLD DNA-Leiter Mix (10 kb; 8 kb; 6 kb; 4 kb; 3,5 kb; 3 kb; 2,5 kb; 2 kb; 1,5 kb; 1,2 kb; 1 kb; 0,9 kb; 0,8 kb; 0,7 kb; 0,6 kb; 0,5 kb; 0,4 kb; 0,3 kb; 0,2 kb; 0,1 kb; peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet.

### 3.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde verwendet um Proteingemische zu charakterisieren und die Reinheit von Proteinproben zu kontrollieren. Dabei wurde das diskontinuierliche System nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde als vertikale Plattengelelektrophorese in Mighty Small SE 250 Elektrophoresekammern (Hoefer Scientific Instruments, Holliston, MA, USA) bei 32 mA und 200 V durchgeführt. Die Gele waren zusammengesetzt aus etwa 7 cm langen Trenngelen und etwa 1 cm langen Sammelgelen und waren 10 cm breit und etwa 0,75 cm mächtig.

Tab. 3.4: Pipettierschema zur Herstellung von je 6 10 %igen, 15 %igen und 19 %igen SDS-Polyacrylamidgelen.

	Trenngel			Sammelgel
	10%	15%	19%	
30 % Acrylamid	11,7 ml	17,5 ml	22,2 ml	3 ml
2 % N,N'-Methylenbisacrylamid	4,7 ml	7,0 ml	8,9 ml	1 ml
3 M Tris/HCl, pH 8,8	4,4 ml	4,4 ml	4,4 ml	-
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	-	-	-	5 ml
10 % SDS	350 $\mu$ l	350 $\mu$ l	350 $\mu$ l	120 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	13,4 ml	5,5 ml	-	10,7 ml
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	5 mg	5 mg	5 mg	-
10 % APS	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	200 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l

Je nach der Größe der zu erwartenden Proteine wurden 19 %ige, 15 %ige oder 10 %ige SDS-Gele gegossen. Beim Gießen der Gele wurde das in Tab. 3.4 dargestellte Pipettierschema eingehalten. Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde als denaturierendes Detergens verwendet. Als radikalische Polymerisations-Starter dienen die Chemikalien Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), nach deren Zugabe die Gellösung in die Kammern gegossen wurde.

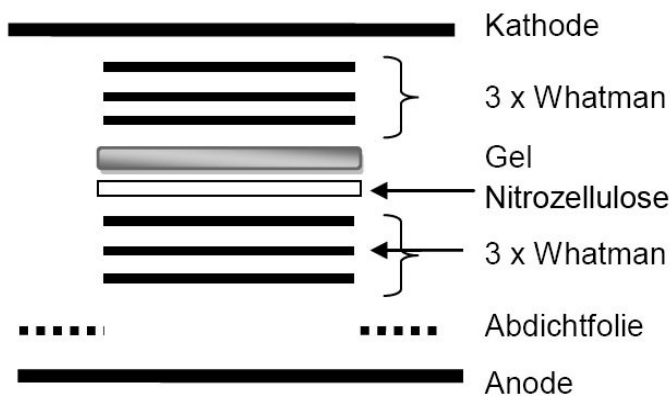
Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris/HCl, pH 8,3, 385 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS verwendet. Die Proteinproben wurden mit gleichem Volumen Probenpuffer (2 × Roti-Load® (Roth Karlsruhe)) gemischt und bei 98 °C für 5 min denaturiert. Bakterienzellpellets wurden mit 100 µl 1 × Roti-Load® versetzt und bei 98 °C 10 min lang denaturiert. Hefezellpellets wurden 100 µl Breaking Buffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,4, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1 mM EDTA, 5 % Glycerol) resuspendiert, mit etwa einem Volumen sauer behandelter Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) versetzt und anschließend 8 Mal je etwa 30 s am Vortex gemischt. Die Proben wurden dann durch Zentrifugation von den Glasperlen und Zelltrümmern getrennt, 1 : 1 mit 2 × Roti-Load® gemischt und 10 min bei 98 °C inkubiert.

Die Gelelektrophorese wurde üblicherweise beendet sobald der im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau-Farbmarker, der im Probenpuffer enthalten ist, das untere Gelende erreicht hatte. Die Probeinbanden wurden sichtbar gemacht, indem die Gele für etwa 30 min in einer Färbelösung (0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Gele bis zum vollständigen Entfärben des Gelhintergrundes, für etwa 8 h, in einer Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure) geschüttelt.

### 3.10.3 Western Blot

Der Western Blot diente dem spezifischen Nachweis der ECD von GC-C bei der Expression in *P. pastoris*. Dabei wurden die Proteine durch SDS-PAGE (Kap. 3.10.2) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) transferiert. Der Nachweis erfolgte schließlich über einen spezifischen Antikörper. Im hier beschriebenen Fall wurde ein polyklonaler Anti-Hexahistidin-Antikörper (Genscript, Cat.-Nr. A00174) verwendet, der in Hasen hergestellt wurde und den Hexahistidin-Anhang des exprimierten GC-C-Konstrukts erkennt. Dieser gebundene primäre Antikörper wurde durch einen sekundären Antikörper, der in Ziegen hergestellt wurde und mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war, detektiert. Die Bande der ECD von GC-C auf der Membran wurde durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht.

Der Transfer der Proteine vom 10 % SDS-Gel auf die Nitrozellulose-Membran wurde als sog. semi-trockener Elektroblot durchgeführt. Nach der SDS-PAGE wurde der Blot wie in Abb. 3.5 dargestellt aufgebaut. Die Anode wurde mit einer Abdichtfolie bedeckt, aus der ein der Größe des Gels entsprechendes Fenster ausgeschnitten wurde. Auf die Anode wurden drei Lagen, Whatman Papier (Chromatography Paper, 3 MM CHR, Whatman International Ltd, Maidstone, UK), die Nitrozellulose-Membran, das SDS-Gel und schließlich drei weitere Lagen Whatman Papier passgenau gelegt. Das Whatman Papier und die Membran wurden mit Transfer-Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,3, 192 mM Glycin, 20 % Methanol (v/v)) befeuchtet. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 40 mA für eine Dauer von 1 h in einer SEMI-PHOR™ Blotting-Kammer (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) durchgeführt.



*Abb. 3.5: Schematischer Aufbau des semi-trockenen Elektroblots, wie er in dieser Arbeit eingesetzt wurde.*

Dann wurde die Membran für 5 min in 20 ml Blocking-Puffer (1 × PBS, 10 % Milchpulver (w/v), 0,05 % Tween 20 (v/v)) geschwenkt. Über Nacht wurde die Membran in 20 ml Blocking-Puffer mit 1 µg/ml des anti-6xHis-Antikörpers (Cat.-Nr. A00174, Genscript, Piscataway, NJ, USA) inkubiert und anschließend 3 mal je 5 min in jeweils 20 ml Wasch-Puffer (1 × PBS, 0,05 % Tween 20 (v/v)) geschwenkt um den ungebundenen primären Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde danach in 20 ml Blocking-Puffer mit 0,7 µg/ml des anti-Hasen Antikörper (Anti-Rabbit IgG – Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich, Steinheim) für 2 h inkubiert. Schließlich wurde sie 3 mal 5 min in je 20 ml 1 × PBS und 3 mal 5 min in je 20 ml AP-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen. Um schließlich die Farbreaktion, mit der die positiven Banden sichtbar gemacht werden, zu starten wurden zu den letzten 20 ml AP-Puffer 33 µl 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP, 42 mg/ml in DMF) und 66 µl Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT, 83 mg/ml in 70 % DMF (v/v)) zupipettiert. Durch die Aktivität von AP wird BCIP dephosphoryliert und anschließend von NBT oxidiert. Dabei bildet sich aus BCIP ein blauer Indigofarbstoff und aus

NBT ein roter Farbstoff. Zusammen ergibt sich nach 5 – 10 min ein violetter Farbumschlag, der die durch die Antikörper detektierten Banden markiert.

### 3.11 Präparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA zu amplifizieren wurde sie durch Elektroporation (Kap. 3.12) in *E. coli* Top10 oder *E. coli* XL1 Blue eingebracht. Die Bakterien wurden in 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert und aus dem Zellpellet wurde die Plasmid-DNA präpariert. Zur Plasmidpräparation wurde der Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien und der Isolierung der Plasmid-DNA durch Anionenaustausch-Chromatographie. Die DNA wurde im letzten Schritt in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt. Die Reinheit der Präparation wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die auf diesem Weg hergestellte DNA wurde anschließend für Sequenzierungen, Klonierungen und Transformationen verwendet.

Da für die Transformation von pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis in *P. pastoris* größere Mengen an Plasmid-DNA nötig waren wurden *E. coli* XL1 Blue mit dem Plasmid transformiert und in 100 ml LB-Medium angezogen. Aus der Bakteriensuspension wurde das Plasmid mit dem Nucleobond® AX Midiprep-Kit (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. Diese Midiprep basiert auf demselben Prinzip wie die Miniprep und unterscheidet sich lediglich im Maßstab der Präparation.

### 3.12 Elektrotransformation von Plasmid-DNA in Bakterien und Hefen

Zur Elektroporation von Plasmiden in Bakterien wurde nur DNA verwendet, die in reinem Wasser gelöst war. Etwa 5 ng Plasmid in einem Volumen von etwa 2 µl wurde mit etwa 80 µl elektrokompenten Bakterien vermischt und in eine 0,1 cm Elektroporationsküvette (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) vorgelegt. Die Elektroporation erfolgte mit einem MicroPulser™ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) und einem Spannungspuls der Stärke 1,8 kV. Nach dem Puls wurden die Bakterien unverzüglich mit 500 µl sterilem LB-Medium vermischt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für etwa 1 h bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 50 µl und 100 µl der Bakteriensuspension auf je eine Agarplatte mit LB-Selektivmedium ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank (Modell 200, Memmert Schwabach) inkubiert. Im Erfolgsfall waren am nächsten Morgen Einzelkolonien zu sehen.

Für die Elektroporation von *P. pastoris* mussten elektrokompetente Hefezellen hergestellt werden. Dazu wurden 5 ml YPD-Medium mit GS115 Zellen aus einer Glycerin-Dauerkultur angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 220 rpm geschüttelt. Anschließend wurden mit 0,1 – 0,15 ml dieser Kultur 500 ml frisches YPD-Medium in einem 2 l Schüttelkolben angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 30 °C und 220 rpm inkubiert bis sie eine OD<sub>600</sub> von etwa 1,5 erreicht hatte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1500 × g, 5 min, 4 °C) geerntet und in 500 ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und die Zellen dabei sukzessive in 250 ml eiskaltem Wasser, 20 ml eiskaltem 1 M Sorbitol und 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol gelöst. Aus der resultierenden Bakteriensuspension (V = 1,5 ml) wurde ein 80 µl-Aliquot genommen und mit etwa 20 – 30 µg Plasmid-DNA versetzt. Da die Plasmide nach der Transformation in *P. pastoris* ins Chromosom integrieren sollen, müssen sie linearisiert sein. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten Konstrukts pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis geschah die Linearisierung durch Restriktion des Plasmids mit *Sac I*, das innerhalb der 5' AOX1-Promotorregion (Kap. 3.2.3) schneidet. Nach der DNA-Zugabe wurde die Zellsuspension in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette (Life Technologies GmbH, Darmstadt) pipettiert, 5 min auf Eis inkubiert und in einem MicroPulser™ Elektroporator (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit einem 2 kV Spannungspuls behandelt. Unmittelbar danach wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl der Suspension auf MD-Agarplatten ausplattiert und im Inkubator bei 30 °C für 2 – 3 Tage inkubiert, bis Kolonien sichtbar waren.

### 3.13 Fällung von DNA

Die Ausfällung von DNA aus wässrigen Lösungen, z. B. Ligationsansätzen, erfolgte durch Ethanol. Dazu wurde die DNA-Probe mit 300 mM LiCl und 10 % Glykogen (v/v) versetzt und anschließend mit dem dreifachen Volumen kaltem Ethanol (-20 °C) vermischt. Der Ansatz wurde dann für 1 h bei -80 °C inkubiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet mit 80 % Ethanol (v/v; -20 °C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und dem Entfernen des Überstands wurde das Pellet im Vakuum getrocknet und schließlich in einem gewünschten Volumen sterilen Wassers aufgenommen.

### 3.14 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von PCR-Fragmenten oder linearisierten Plasmiden wurden die entsprechenden

Proben auf eine Agarosegel aufgetragen und der Elektrophorese unterzogen (Kap. 3.10.1). Die gewünschte Bande wurde ausgeschnitten und die in dem Gel enthaltene DNA unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Dabei wurden die Anweisungen des Herstellers genau befolgt und die Qualität der resultierende DNA-Probe anschließend durch analytische Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

### **3.15 Enzymatische Behandlung von DNA**

#### **3.15.1 Restriktion**

DNA von Plasmiden oder PCR-Fragmenten wurde an spezifischen Erkennungssequenzen von Typ II Restriktionsendonukleasen (Kap. 3.5) geschnitten. Dazu wurden die Konzentrationen der DNA-Proben auf Werte im Bereich von 0,3 – 0,5 µg/µl eingestellt und mit dem vom Hersteller der Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Schwalbach) vorgesehenen Puffer versetzt. Bei Restriktionen mit *Sac I*, *Xho I* und *Bam HI* wurde dem Ansatz zudem noch BSA zugegeben. Es wurden zwischen 1 U und 5 U des jeweiligen Enzyms pro µg zu schneidender DNA eingesetzt. Anschließend wurden die Ansätze für etwa 3 h bei 37 °C inkubiert (Brutschrank, Modell 200, Memmert, Schwabach) und die geschnittene DNA schließlich durch Agarosegelelektrophorese von eventuell noch vorhandener ungeschnittener DNA getrennt.

#### **3.15.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden**

Um zu verhindern, dass während der Ligation leere Vektoren religieren ohne ein PCR-Fragment aufzunehmen, wurden die 5'-Phosphate der linearisierten Vektoren durch antarktische Phosphatase (AP, New England Biolabs, Schwalbach) entfernt. Dazu wurde der DNA der vom Hersteller gelieferte Puffer (10 × AP-Puffer, New England Biolabs, Schwalbach) sowie pro µg DNA etwa 1 U Phosphatase zugesetzt. Die Dephosphorylierung verlief bei 37 °C für etwa 20 min und wurde durch Hitzeinaktivierung der Phosphatase (65 °C, 5 min) abgebrochen. Anschließend wurden die dephosphorylierten Vektoren durch den QIAquick® Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Ansatz isoliert und in 50 µl reinen Wassers eluiert.

### 3.15.3 Ligation

Für die Ligation von doppelt verdauten Vektoren mit durch PCR amplifizierten, doppelt verdauten DNA-Fragmenten wurden Vektor und Fragment im molaren Verhältnis 1 : 3 eingestetzt. Pro etwa 80 – 150 ng Vektor wurden 400 U T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Schwalbach) in T4-DNA-Ligasepuffer eingesetzt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Als Kontrollen dienten der Ligationsansatz ohne DNA-Fragment sowie der Ligationsansatz ohne DNA-Fragment und T4 DNA Ligase. Nach dem Ende der Reaktion wurden der Ligationsansatz sowie die beiden Kontrollen durch Ethanol-fällung (Kap. 3.13) und Resuspension in je 10 µl H<sub>2</sub>O konzentriert und in *E. coli* Top10 oder *E. coli* XL1 Blue transformiert (Kap. 3.12). Aus den gewonnenen Einzelkolonien wurde das Plasmid präpariert und die Ligation durch Sequenzierung (LGC Genomics, Berlin) überprüft.

### 3.15.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt (Saiki *et al.*, 1985). Die Verwendung von synthetischen DNA-Primern mit überstehenden Enden, die sog. Linker-PCR, erlaubt es, eine definierte DNA-Sequenz zu amplifizieren und gleichzeitig die flankierenden Bereiche des Fragments zu modifizieren, etwa um Schnittstellen für Restriktionsenzyme oder Sequenzen, die für Hexahistidin-Anhänge oder Protease-Schnittstellen kodieren, einzufügen. Auf diese Weise können DNA-Fragmente präpariert werden, die sich für den Einbau in neue Vektoren eignen.

Die verwendeten Primer besaßen eine zur jeweiligen Matrize komplementäre 3'-Region von etwa 20 bp. Im 5'-Bereich der Primer wurden die Restriktionsschnittstellen und andere benötigte DNA-Sequenzen eingeführt.

Zur Durchführung der Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl etwa 50 ng Matrizen-DNA, 2 µM der jeweiligen Primer, 200 µM dNTPs und 2 U *Vent* DNA-Polymerase gemischt. Als Puffer wurde der sog. ThermoPol Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,8, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 % Triton X-100) von New England Biolabs (Schwalbach) verwendet. Die Reaktion wurde in einem Primas 25 advanced Thermozykler (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt. Tab. 3.5 zeigt das für alle in dieser Arbeit durchgeführten Linker-PCRs verwendete PCR-Programm. Nach einem initialen Aufschmelzen der Matrizen-DNA (95 °C, 5 min) folgten 40 identische Temperaturzyklen, die jeweils aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Hybridisierung der Primer bei 55 °C und 2 min Primer-Verlängerung durch *Vent* DNA-Polymerase



bei 72 °C bestanden. Zum Schluss wurde die Probe für 4 min bei 72 °C inkubiert um unvollständige DNA-Doppelstränge aufzufüllen und dann bei 4 °C inkubiert. Das Produkt der PCR wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion gereinigt (Kap. 3.14).

Tab. 3.5: In dieser Arbeit bei Linker-PCRs verwendetes PCR-Programm.

Temperatur [°C]	Dauer [min]	
95	5	
95	0,5	40 x
55	0,5	
72	2	
72	4	
4	∞	

### 3.15.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese von Plasmiden wurde mit Hilfe des QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kits (Agilent Technologies, Böblingen) durchgeführt. Sie erlaubt den Austausch, die Deletion oder Insertion spezifischer Basen in einem Plasmid. Dabei werden geeignete zur Zielsequenz im Plasmid und zueinander komplementäre Primer verwendet, welche die gewünschte Mutation enthalten. Mit diesen Primern wird die gesamte Plasmid-DNA durch PCR amplifiziert. Dabei wird die PfuTurbo® DNA-Polymerase verwendet und es entstehen mutierte Plasmide mit versetzten Einzelstrangbrüchen. Da das Matrizenplasmid üblicherweise durch Präparation aus *E. coli* erhalten wurde, enthält es Methylierungen durch DNA-Adenin-Methyltransferase (*Dam*) und kann durch die *Dam*-spezifische Restriktionsendonuclease *Dpn I* abgebaut werden. Die neu synthetisierte, die Mutation enthaltene, DNA ist nicht methyliert und deshalb vor *Dpn I* geschützt. Das verbliebene mutierte Plasmid kann direkt in *E. coli* Top10 oder *E. coli* XL1 Blue transformiert werden. Die daraus präparierten mutierten Plasmide wurden abschließend sequenziert.

### 3.16 Glycerin-Dauerkulturen von *E. coli*-Klonen

Zur Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen von *E. coli* wurden 10 ml LB-Selektivmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 160 rpm bis zum Erreichen eines

OD<sub>600</sub>-Werts von etwa 2,0 – 3,0 geschüttelt. 1,5 ml dieser Bakterienkultur wurden mit 350 µl 87 % Glycerin (v/v) gemischt und in einem 2 ml Kryogefäß (Nunc CryoTube™ Vials, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) bei -80 °C eingefroren.

### 3.17 Expression von Trx-Prouroguanylin, Trx-Prouro-STh und ihrer mutierten Varianten

Induktionstests dienten dazu, die Expression von rekombinanten Proteinen durch *E. coli* Origami B (DE3) nach Induktion mit IPTG zu überprüfen. Außerdem wurde kontrolliert, ob sich die für die Bakterienanzucht in Vollmedium entwickelten Protokolle auf die Expression in isotopenmarkiertem M9-Minimalmedium übertragen lassen. Die Induktionstests wurden in Volumina von 100 ml LB oder M9 Medium in 1 l Schüttelkolben mit Schikanen durchgeführt. Zur präparativen Gewinnung der Proteine wurden die Bakterien dagegen in größeren Volumina von 4 – 6 l Medium kultiviert. Zunächst wurden 10 ml LB-Medium, welches 100 µg/ml Ampicillin enthielt, mit einer gut separierten Einzelkolonie oder einer Glycerin-Dauerkultur (Kap. 3.16) angeimpft und über einen Zeitraum von 6 – 10 Stunden bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Induktionstests wurden direkt mit dieser Starterkultur angimpft. Im Falle präparativer Bakterienanzuchten in LB- oder M9-Medium wurde zunächst eine weitere 500 ml Vorkultur angeimpft, die das entsprechende Medium sowie 100 µg/ml Ampicillin enthielt, und diese dann über Nacht bei 37 °C und 160 rpm im Schüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 2 × 2 l des entsprechenden Mediums inklusive Ampicillin in 5 l Schüttelkolben mit Schikanen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,15 – 0,25 inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt bis eine OD<sub>600</sub> von 0,7 (bei Trx-Prouroguanylin, Trx-Prouroguanylin A72R D75E und Trx-Prouroguanylin Δ<sub>TIA</sub> D75E) bzw. 0,8 (bei Trx-Prouro-STh, Trx-Prouro-STh-L78Y und Trx-Prouro-STh-Y74R-L78Y) erreicht war. Durch die Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM ins Kulturmedium wurde die Expression der rekombinanten Fusionsproteine induziert.

Die Temperatur, bei der die Proteinexpression erfolgte, sowie die Dauer der Expression unterschieden sich je nach verwendetem Medium und exprimiertem Protein. Bei Trx-Prouroguanylin, Trx-Prouroguanylin A72R D75E und Trx-Prouroguanylin Δ<sub>TIA</sub> D75E wurde in LB-Medium nach der Induktion die Temperatur von 37 °C beibehalten und die Zellen wurden nach 5 h geerntet. In M9-Medium dagegen wurde die Temperatur des Mediums nach der IPTG-Zugabe auf 20 °C gesenkt und die Proteinexpression erfolgte über Nacht, typischerweise für eine Dauer von 20 – 22 h. Bei Trx-Prouro-STh, Trx-Prouro-STh-L78Y und Trx-Prouro-STh-Y74R-L78Y wurde die

Temperatur in LB- und M9-Medium nach Induktion auf 25 °C gesenkt und die Kultur über Nacht für etwa 18 h inkubiert.

Die Zellernte erfolgte 5 – 18 h nach der Induktion durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4 °C).

Die erhaltenen Zellpellets wurden entweder gleich aufgeschlossen oder bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.18 Lyse der Zellen und Reinigung der Fusionsproteine

Die Zellpellets wurden in etwa 10 ml Lysepuffer pro Gramm Nasszellgewicht resuspendiert und 30 min auf Eis gerührt. Der Lysepuffer enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl sowie je etwa 100 mg/l DNase I und Lysozym und eine Proteaseinhibitor-Tablette (Proteaseinhibitor-Cocktail, EDTA-free, Roche, Mannheim). Der Zellaufschluss erfolgte an einem Microfluidics 110L Microfluidizer (Newton, MA, USA) für etwa 3 min. Durch Zentrifugation (30 min, 12000 × g, 4 °C) wurden der lösliche Rohextrakt und das unlösliche Lysepellet voneinander getrennt. Das Lysepellet wurde in 40 bis 50 ml Harnstoffpuffer resuspendiert. Der Puffer enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl sowie 4 M (bei Trx-Prouroguanylin, Trx-Prouroguanylin A72R D75E und Trx-Prouroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D75E) bzw. 8 M (bei Trx-Prouro-STh, Trx-Prouro-STh-L78Y und Trx-Prouro-STh-Y74R-L78Y) Harnstoff. Nachdem die Suspension für ca. 3 h bei 4 °C gerührt wurde, wurde sie erneut zentrifugiert (30 min, 12000 × g, 4 °C), um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Dann wurde die Lösung durch Zugabe von einem Volumenäquivalent Lysepuffer auf eine Harnstoffkonzentration von 2 M bzw. 4 M verdünnt. Im Falle der Reinigung von Trx-Prouro-STh, Trx-Prouro-STh-L78Y und Trx-Prouro-STh-Y74R-L78Y wurde der 4 M Harnstoff enthaltende Extrakt nochmals für etwa 2 h bei 4 °C gerührt und dann durch Zugabe eines Volumenäquivalents Lysepuffer auf eine Harnstoffkonzentration von 2 M verdünnt. Die Extrakte wurden schließlich nochmals für 30 min bei 12000 × g und 4 °C zentrifugiert, um ausgefallenes Protein zu entfernen. Die Reinigung des Fusionsproteins aus dem Harnstoffextrakt erfolgte durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie unter Verwendung einer mit 30 ml 50 mM CoCl<sub>2</sub> beladenen HiPrep<sup>TM</sup> IMAC FF 16/10 Säule (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) und eines ÄKTA *purifier* Systems (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg). Die mit Cobalt beladene Säule wurde zunächst mit etwa 10 CV (engl.: column volume, Säulenbettvolumina) Wasser gewaschen und mit etwa 5 CV Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl) äquilibriert. Die Flußrate während der gesamten chromatographischen Trennung betrug 1 ml/min. Nach dem Auftragen des Harnstoffextrakts wurde die Säule mit 6 CV Bindungspuffer gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Stufengradienten eluiert. Als Elutionspuffer diente 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl,

1 M Imidazol und die Elutionsstufen waren 2,5 % (4 CV), 20 % (6 CV), 50 % (4 CV) und 100 % (4 CV) Elutionspuffer. Nach der Elution wurde die Säule mit 10 CV Wasser und 2 CV 20 % Ethanol (v/v) gewaschen und bis zur nächsten Verwendung bei 4 °C gelagert.

Aus den eluierten Fraktionen, die eine deutliche Absorption bei 280 nm zeigten, wurden 50 µl Proben zur elektrophoretischen Analyse (Kap. 3.10.2) entnommen. Die Fraktionen, in denen das Fusionsprotein identifiziert werden konnte, wurden vereint und gegen 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl dialysiert.

### **3.19 Entfernen des Fusionsanhangs Trx**

#### **3.19.1 Behandlung mit PreScission-Protease**

Zwischen den Trx- und 6xHis-Anhängen und dem jeweiligen Zielprotein liegt jeweils eine PreScission-Spaltstelle. Vor der proteolytischen Spaltung wurde das Fusionsprotein für 4 h gegen den Spaltpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl) dialysiert. Dann wurden etwa 0,8 mg PreScission pro mg Fusionsprotein in den Dialyseschlach pipettiert und die Dialyse über Nacht fortgesetzt (4 °C, 20 h). Anschließend wurde der Erfolg der Spaltung gelelektrophoretisch überprüft (Kap. 3.10.2) und der Ansatz gegen 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl dialysiert. Auf eine Inaktivierung der Protease wurde verzichtet.

#### **3.19.2 Isolierung des Proteins ohne Fusionspartner**

Die PreScission-Protease enthält einen Glutathion-S-Transferase(GST)-Anhang und kann durch Affinitätschromatographie mit einer GSTrap<sup>TM</sup>-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) aus dem Spaltansatz entfernt werden. Dazu wurde die GSTrap<sup>TM</sup>-Säule (1 CV = 5 ml) mit 10 CV Wasser gewaschen und mit 3 CV Bindungspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl) äquilibriert. Anschließend wurde die Probe mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen und die Säule mit 4 CV Bindungspuffer gewaschen. Mit den vereinigten Säulendurchbruch- und die Waschfraktionen wurde weitergearbeitet während die GSTrap<sup>TM</sup>-Säule mit 2 CV 20 mM reduziertem Glutathion, 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl eluiert und mit 10 CV Wasser und 2 CV 20 % Ethanol gewaschen wurde.

Aus den vereinigten Fraktionen wurden ungespaltenes Fusionsprotein sowie die abgespaltenen Trx- und 6xHis-Anhänge durch Nickelionen-Affinitätschromatographie entfernt. Dazu wurde eine 5 ml

HisTrap<sup>TM</sup>-Säule mit 3 CV 50 mM NiSO<sub>4</sub> beladen, mit 10 CV Wasser gewaschen und mit 5 CV Bindungspuffer äquilibriert. Danach wurde die Säule mit der Probe beladen und mit 4 CV Bindungspuffer gewaschen, wobei die Flussrate jeweils 1 ml/min betrug. Das gespaltene Zielprotein befand sich im Durchbruch, so dass die Durchbruchsfraction und die Waschfraction vereinigt und dialysiert wurden. Abschließend wurde die Säule mit 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 M Imidazol eluiert und mit 10 CV Wasser und 2 CV 20 % Ethanol gewaschen.

Die chromatographische Reinigung des Zielproteins wurde gelelektrophoretisch überprüft (Kap. 3.10.2). Prouroguanylin wurde gegen Wasser dialysiert, während alle anderen in dieser Arbeit gereinigten Vorläuferproteine gegen 1 mM Tris/HCl, pH 8,0 dialysiert wurden. Schließlich wurden die gereinigten Proteine an einer CHRIST LOC-1M Lyophylle (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) gefriergetrocknet.

### **3.20 Freisetzung der Peptide**

#### **3.20.1 Trypsin-Verdau**

Uroguanylin, STh und ihre mutierten Varianten lassen sich aus den entsprechenden Vorläuferproteinen durch tryptischen Verdau freisetzen. Dazu wurden 10 mg des entsprechenden gefriergetrockneten Proteins in 5 ml 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7,8 gelöst und für etwa 10 min bei 37 °C geschüttelt. Außerdem wurden 60 µg Trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega Corp., Madison, WI, USA) in 600 µl des mitgelieferten Resuspensionspuffers gelöst und ebenfalls etwa 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Lösung wurde zum Vorläuferprotein-Probe zupipettiert und die Spaltung erfolgte bei 37 °C und 160 rpm im Schüttelinkubator. Sie wurde nach 18 h Inkubationszeit durch die Zugabe von 1 M HCl bis zum Erreichen eines pH-Werts von etwa 3, beendet. Anschließend wurde der Probe 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA, v/v) zugesetzt und evtl. vorhandene Schwebeteilchen durch Zentrifugation (10 min, 12000 × g, 4 °C) entfernt.

#### **3.20.2 *Reversed-phase high performance liquid chromatography* (RP-HPLC)**

Da sich die C-terminalen Peptide nach der Freisetzung aus ihren Vorläuferproteinen in einem Gemisch von verschiedenen Spaltfragmenten befinden, war eine erneute chromatographische Auftrennung nötig. Durch Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) können Peptide durch ihre unterschiedliche Hydrophobizität voneinander getrennt werden. Die Chromatographie wurde an

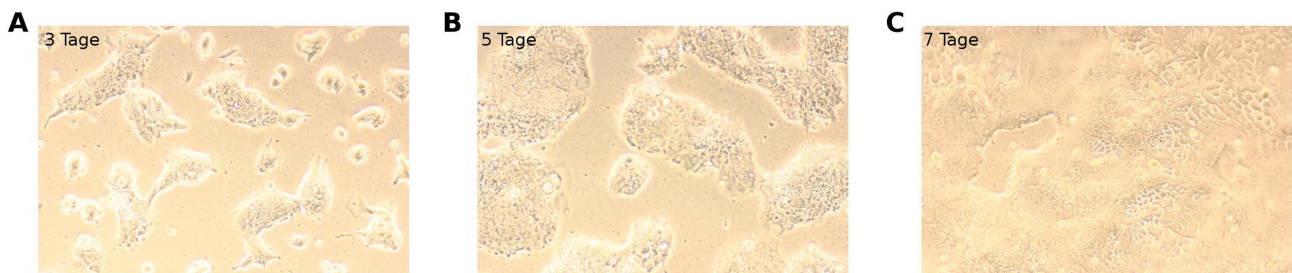
einem Waters Delta 600 HPLC-Pumpensystem (Waters GmbH, Eschborn) unter Verwendung einer Resource<sup>TM</sup> RPC (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, *ehemals Amersham Biosciences*) mit 3 ml Bettvolumen durchgeführt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus 0,1 % TFA (v/v) in H<sub>2</sub>O (Puffer A) und 80 % Acetonitril (v/v), 0,1 % TFA (v/v) (Puffer B) verwendet. Es wurden 5 ml der gespaltenen Probe aufgetragen und als Flussrate wurde ein Wert von 3 ml/min eingestellt. Die Konzentration des Lösungsmittels in der mobilen Phase wurde durch einen konstanten Gradienten von 10 % auf 60 % Puffer B über ein Elutionsvolumen von 180 ml hinweg erhöht. In diesem Teil des Chromatographie-Programms erfolgte die Elution der meisten in der Probe enthaltenen Peptide. Anschließend wurde der Anteil des Puffers B über ein Elutionsvolumen von 9 ml konstant auf 100 % gesteigert und die Säule mit 21 ml reinem Puffer B über die Säule gewaschen. Schließlich wurde der Anteil des Puffers B in der mobilen Phase innerhalb eines eluierten Volumens von 6 ml wieder bis auf 10 % verringert.

Die Elution der Peptide wurde durch Messung der Absorption bei 220 nm und 280 nm (Waters 2487 Dual Wavelength Detector, Waters GmbH, Eschborn) verfolgt und das Eluat in 1,5 ml Fraktionen aufgefangen. Diejenigen Fraktionen, in denen die C-terminalen Peptide identifiziert wurden, wurden mit Hilfe einer CHRIST Alpha RVC Vakuumzentrifuge (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) getrocknet.

### **3.21 Nachweis der biologischen Aktivität**

#### **3.21.1 Kultivierung von T84 Zellen**

T84-Zellen wurden verwendet, um die biologische Aktivität von Uroguanylin, STh und ihren Varianten zu überprüfen und zu quantifizieren. Die Zellen (Passage 18) wurden aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karl Kunzelmann (Department of Physiology, Universität Regensburg) bezogen. Sie wurden in DMEM/F12 + GlutaMAX<sup>TM</sup> Medium, dem 5 % (v/v) fetales Rinderserum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin Antibiotikamix zugesetzt waren, (Kap. 3.4.3) angezogen. Zur Anzucht wurden 250 ml Kulturflaschen verwendet. Nach dem Animpfen von 10 ml Medium wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach jeweils 3 und 5 Tagen wurde das Medium in den Flaschen abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. 7 Tage nach dem Animpfen war die Kulturflasche in der Regel mit einer konfluenten Zellmonoschicht bewachsen und die Zellen wurden durch Subkultur auf zwei neue Kulturflaschen mit je 10 ml frischem Medium aufgeteilt. Abb. 3.6 zeigt die Morphologie der T84-Zellen jeweils am 3., 5. und 7. Tag nach dem Animpfen.



*Abb. 3.6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von T84-Zellen A) drei Tage, B) fünf Tage und C) sieben Tage nach dem Animpfen der Kulturflasche.*

Zur Subkultur wurde das alte Medium in den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen durch die vorsichtige Zugabe von 10 ml vorgewärmten PBS (37 °C) gewaschen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen nicht von der Gefäßwand lösen und nicht bei Absaugen des PBS mit verloren gehen. Anschließend wurden 2 ml einer auf 37 °C vorgewärmten Lösung von 0,26 % Trypsin und 0,02 % EDTA zugegeben und die Flasche für 10 min bei 37 °C inkubiert. Da durch das Trypsin die extrazellulären Membranproteine der Zellen gespalten werden, darunter auch diejenigen Proteine, welche die Adhäsion an die Gefäßwand vermitteln, lösen sich die Zellen und gehen in Suspension. Die Wirkung der Protease wurde schließlich durch die Zugabe von 18 ml warmen Kulturmediums (37 °C) unterbrochen und die Zellsuspension wurde in zwei frische Kulturflaschen aufgeteilt.

### **3.21.2 DMSO-Dauerkulturen von eukaryotischen Zellen**

Für eine 1 ml Kryokultur wurden die in einer vollständig bewachsenen Kulturflasche enthaltenen Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin geerntet, in 5 ml Medium resuspendiert und zentrifugiert (5 min,  $250 \times g$ , 4 °C). Anschließend wurden sie in 1 ml FBS, 10 % DMSO (v/v) resuspendiert und in einem 1 ml Kryobehälter (Nunc CryoTube™ Vials, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) bei -80 °C eingefroren. Es wurde darauf geachtet, dass die Temperaturabnahme nicht schneller als 2 °C pro Minute verlief. Nach 12 Stunden wurden die Kulturen in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zum Animpfen aus den Kryokulturen wurde der Inhalt eines gesamten 1 ml Kryogefäßes bei 37 °C aufgetaut und in 5 ml Kulturmedium in einer 50 ml Kulturflasche überführt. Nach 8 h Inkubation wurden vorsichtig 3 ml des Mediums entfernt und durch 3 ml frischen Mediums ersetzt um die

Konzentration des giftigen DMSO zu verringern. Nach einer Woche Inkubation, wobei das Medium regelmäßig gewechselt wurde, wurden die Zellen in eine 250 ml Kulturflasche überführt.

### 3.21.3 *In vitro* Aktivitätstest

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität der gereinigten Liganden von GC-C wurden T84-Zellen in 24-Well-Platten angeimpft. Dabei wurden jeweils die in einer voll bewachsenen 250 ml Kulturflasche enthaltenen Zellen in insgesamt 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden je 0,5 ml pro Well zum Animpfen eingesetzt. Die Zellen wurden 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert bis sich eine konfluente Zellmonoschicht in den Wells ausgebildet hatte. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt.

Für den *in vitro* Aktivitätstest wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und die Zellen mit 0,5 ml PBS pro Well gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,5 ml OPTI-MEM® I Medium (Life Technologies GmbH, Darmstadt) pro Well überschichtet. In dem Medium war außerdem 1 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), ein Inhibitor von Phosphodiesterase, enthalten. Die Zellen wurden 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend wurden je 50 µl pro Well der in 200 mM HEPES, pH 7,4 gelösten Peptide zugegeben. Typische Endkonzentrationen von verwendeten Peptiden waren 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM und 1 µM. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit Puffer inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen für 1 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Das Medium mit den enthaltenen Peptiden wurde abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von je 200 µl 0,1 M HCl und 20-minütige Inkubation lysiert. Die Überstände der Lyse wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und für 5 min bei 600 × g zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Die in jeweils 100 µl dieser sauren Zellextrakte enthaltene cGMP-Menge wurde schließlich mit dem cGMP Enzyme Immunoassay Kit, Direct (Sigma-Aldrich, Steinheim) bestimmt, wobei die Vorgaben des Herstellers genau befolgt wurden. An dieser Stelle soll kurz das dem Kit zugrunde liegende Nachweisprinzip erklärt werden:

Es handelt sich um einen kompetitiven Immunoassay, bei dem zur Detektion ein synthetisches Konjugat aus cGMP und alkalischer Phosphatase (AP) eingesetzt wird, das mit den nachzuweisenden cGMP-Molekülen um die Bindung an einen polyklonalen anti-cGMP Antikörper aus Hasen konkurriert. Die Adsorption dieses Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt in einer mit anti-Hasen IgG beschichteten 96-Well-Platte. Nach mehreren Waschschritten wird die Menge des gebundenen cGMP-AP-Konjugats durch eine Farbreaktion, die AP-abhängige Spaltung von *p*-Nitrophenylphosphat, bestimmt und durch Messung der Absorption bei 405 nm unter Verwendung



eines Microplate-Readers (Model 550, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) detektiert. Zur Eichung wurden cGMP-Standardlösungen mit definierten Konzentrationen verwendet. Da es sich um einen kompetitiven Test handelt, ist die Menge des in der Probe vorhandenen Analyten indirekt proportional zur Stärke des detektierten Farbsignals. Je mehr cGMP in der Probe enthalten war desto weniger cGMP-AP-Konjugat kann schließlich im entsprechenden Well nachgewiesen werden.

### 3.22 Expression von NusA-C489A-MiniGC-C

Zum Animpfen einer Kultur mit Origami B (DE3) pET43.1a-NusA-C489A-MiniGC-C wurden ausschließlich Einzelkolonien von Agarplatten mit frisch transformierten Zellen verwendet. Das Animpfen aus Glycerin-Dauerkulturen führt zu sehr niedrigen Expressionsraten und geringen Ausbeuten. Es wurde eine 10 ml LB-Kultur, die 100 µg/ml Ampicillin enthielt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und für etwa 10 h bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend in 500 ml einer LB- oder M9-Vorkultur, die über Nacht inkubiert wurde (37 °C, 160 rpm, ca. 14 h), übergeimpft. Mit der Vorkultur wurden schließlich 2 × 2 l LB- oder M9-Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft und solange unter den gleichen Bedingungen inkubiert bis ein OD<sub>600</sub>-Wert von 0,7 erreicht war. Die Temperatur des Inkubators wurde auf 25 °C herabgesetzt und 30 min später die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 0,1 mM IPTG ins Medium induziert. Nach weiteren fünf Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 5500 × g, 4 °C) geerntet und über Nacht bei -20 °C eingefroren.

### 3.23 Reinigung von NusA-C489A-MiniGC-C

Das Zellpellet wurde aufgetaut und in 5 ml Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,9; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 100 mg/l Lysozym sowie eine Proteaseinhibitortablette pro 500 ml) resuspendiert und 1 h auf Eis gerührt. Der Zellaufschluss wurde an einem Microfluidics 110L Microfluidizer (Newton, MA, USA) durchgeführt. Durch Zentrifugation für 30 min bei 12000 × g und 4 °C wurden Überstand und unlösliches Pellet der Lyse voneinander getrennt. Das Pellet wurde daraufhin in 80 ml Lysepuffer resuspendiert und darin noch enthaltenes Fusionsprotein durch Ultraschallbehandlung (LABSONIC® P Sonifier, mit 14 mm Schwingsonde, B. Braun Biotech Int. GmbH, Melsungen; Zyklus 1, 100 % Amplitude, 5 × 1 min) solubilisiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 12000 × g, 4 °C) wurde der erhaltene Überstand mit dem Überstand der Lyse am Microfluidizer vereinigt und auf zwei hintereinander geschaltete mit 2 CV 50 mM

NiSO<sub>4</sub> beladene 5 ml HiTrap™ Chelating HP Säulen aufgetragen (1 CV = 10 ml). Die Säule wurde anschließend mit 5 CV Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol) gewaschen und mit einem Stufengradient eluiert. Die Elutionsstufen waren: 2,5 % (6 CV), 10 % (6 CV), 20 % (4 CV), 50 % (4 CV), 100 % (4 CV). Der verwendete Elutionspuffer enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 M Imidazol. Das Fusionsprotein NusA-C489A-MiniGC-C eluierte von der Säule bei Imidazolkonzentrationen von 100 – 200 mM und wurde fraktioniert aufgefangen. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (Kap. 3.10.2) analysiert und diejenigen Fraktionen, die NusA-C489A-MiniGC-C enthielten wurden vereinigt und gegen 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl dialysiert.

### **3.24 Entfernen des Fusionsanhangs NusA-C489A**

#### **3.24.1 PreScission-Verdau**

Um den NusA-C489A- sowie den 6xHis-Anhang zu entfernen wurde das Fusionsprotein mit PreScission-Protease gespalten. Dazu wurden zur Probe im Dialyseschlauch etwa 0,8 mg PreScission pro mg Fusionsprotein zupipettiert und der Ansatz bei 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl über Nacht weiterdialysiert. Nach ca. 14 h wurde das NaCl aus dem Dialysepuffer entfernt und die Probe für weitere 24 h gegen 20 mM TrisH/Cl, pH 8,0 dialysiert.

#### **3.24.2 Reinigung von MiniGC-C**

Die im Spaltansatz enthaltene PreScission-Protease wurde, wie in Kap. 3.19.2 beschrieben, durch eine GSTrap™-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) entfernt. MiniGC-C und der Fusionspartner NusA-C489A wurden durch Anionenaustausch-Chromatographie mit Hilfe zweier hintereinandergeschalteten 5 ml HiTrap™ QXL Säulen voneinander getrennt. Als Bindungspuffer wurde 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 verwendet, während der Elutionspuffer zusätzlich 1 M NaCl enthielt. Die Flussrate wurde auf 1 ml/min eingestellt und die Säule in 5 CV Bindungspuffer äquilibriert, mit dem Spaltansatz beladen, mit 4 CV Bindungspuffer gewaschen und schließlich eluiert. Die Elutionsstufen waren: 5 % (3 CV), 10 % (5 CV), 20 % (8 CV), 50 % (4 CV) und 100 % (4 CV). Freies MiniGC-C eluiert bei einer NaCl-Konzentration im Puffer von 200 mM während der NusA-Anhang nicht vor 500 mM NaCl von der Säule gewaschen wird. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen und diejenigen Fraktionen, in denen MiniGC-C gelektrophoretisch nachgewiesen

werden konnte (Kap. 3.10.2), wurden vereinigt und gegen 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM NaCl dialysiert und dann für weitere Experimente verwendet.

### 3.25 Expression von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C und Trx-ECD-GC-C

Sowohl Trx-ECD-GC-C als auch NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C wurden in *E. coli* Origami B (DE3) exprimiert. Die Bakterien wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angezogen. Dazu wurden jeweils 10 ml LB-Medium mit Einzelkolonien inokuliert und bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt. Diese Kulturen wurden nach etwa 10 h in 500 ml LB überführt und über Nacht unter den gleichen Bedingungen inkubiert bis sie nach 14 h dazu verwendet wurden um jeweils 2 × 2 l LB-Medium auf einen OD<sub>600</sub>-Wert von 0,3 anzuimpfen. Die Bakterienkulturen wurden solange bei 37 °C weiterinkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,9 erreicht war. Sobald dies der Fall war, wurde die Temperatur auf 20 °C gesenkt und die Expression der Zielproteine induziert. Dies geschah im Fall von Trx-ECD-GC-C mit 0,1 mM IPTG und im Fall von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C mit 1 mM IPTG. Nach 18 h induzierter Proteinexpression wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 5500 × g, 4 °C) geerntet.

### 3.26 Reinigung von Trx-ECD-GC-C

Die geernteten Zellpellets wurden in 20 ml Lysepuffer pro Gramm Nasszellgewicht resuspendiert und 30 min auf Eis gerührt. Der Lysepuffer enthielt 50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol sowie jeweils etwa 100 mg/l DNase I und Lysozym und eine Proteaseinhibitortablette. Die resuspendierten Zellen wurden am Microfluidizer (110L, Microfluidics, Newton, MA, USA) aufgeschlossen. Das Lysat wurde anschließend zentrifugiert (30 min, 12000 × g, 4 °C) und das unlösliche Pellet, welches das Fusionsprotein enthielt, wurde in 50 ml Harnstoffpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 8 M Harnstoff) resuspendiert. Nach 3 h Extraktion wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (30 min, 12000 × g, 4 °C) und der lösliche Überstand im Verhältnis 1 : 1 mit Lysepuffer verdünnt. Dann wurde der Extrakt ca. 2 h auf Eis gerührt und schließlich erneut im Verhältnis 1 : 1 mit Lysepuffer versetzt, so dass die Endkonzentration an Harnstoff bei 2 M lag. Nach etwa 2 h Rühren auf Eis war in der Probe ein weißer Niederschlag präzipitierten Proteins sichtbar, der durch Zentrifugation entfernt wurde (30 min, 12000 × g, 4 °C). Der Überstand der Zentrifugation wurde auf eine 5 ml HiTrap<sup>TM</sup> Chelating HP Säulen, die mit Ni<sup>2+</sup> beladen war, aufgetragen. Die Säule wurde mit 5 CV

Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol) gewaschen, und in einem Stufengradienten mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 M Imidazol) eluiert. Die Elutionsstufen waren 2,5 % (5 CV), 5 % (2 CV), 10 % (3 CV), 20 % (5 CV), 50 % (4 CV) und 100 % (2 CV) und die Flussrate betrug 1 ml/min. Diejenigen Fraktionen, in denen Trx-ECD-GC-C durch SDS-PAGE (Kap. 3.10.2) nachgewiesen wurde, wurden vereinigt und gegen 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 200 mM NaCl dialysiert. Während dieser Dialyse präzipitierte nahezu das gesamte gereinigte Trx-ECD-GC-C.

### 3.27 Reinigung von ECD-GC-C aus NusA-Cys-ECD-GC-C

Die Zellen wurden in 20 ml Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 0,05 % Brij-35, 100 mg/l DNase I, 100 mg/l Lysozym, eine Proteaseinhibitortablette pro 500 ml Puffer) resuspendiert, 30 min auf Eis gerührt und anschließend am Microfluidizer (110L, Microfluidics, Newton, MA, USA) aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 30 min bei  $12000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und die unlöslichen Bestandteile in 80 ml Lysepuffer resuspendiert. Durch Ultraschallbehandlung wurde versucht, einen Teil des noch nicht vollständig gelösten Fusionsproteins zu solubilisieren (LABSONIC® P Sonifier, mit 14 mm Schwingsonde, B. Braun Biotech Int. GmbH, Melsungen; Zyklus 1, 100 % Amplitude,  $5 \times 1$  min). Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Überstände der Lyse und der Ultraschallbehandlung vereinigt und auf zwei hintereinander geschalteten, mit 2 CV 50 mM  $\text{NiSO}_4$  beladenen 5 ml HiTrap™ Chelating HP Säulen aufgetragen (1 CV = 10 ml). Nach dem Auftragen der Probe wurden die Säulen mit 4 CV Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol) gewaschen, und mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 M Imidazol) in einem Stufengradienten eluiert. Die Elutionsstufen waren 2,5 % (3 CV), 5 % (2 CV), 10 % (2 CV), 15 % (2 CV), 20 % (2 CV), 30 % (2 CV), 50 % (3 CV), 100 % (3 CV). Die Flussrate bei der chromatographischen Trennung betrug 1 ml/min. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen und diejenigen Fraktionen, die bei Imidazolkonzentrationen von 50 mM und 100 mM eluierten und eine starke Absorption bei 280 nm zeigten, wurden vereinigt und mit PreScission-Protease gespalten. Die Spaltung vollzog sich, wie schon für NusA-C489A-MiniGC-C beschrieben (Kap. 3.24.1), während der Dialyse gegen 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl. Anschließend wurde die NaCl Konzentration durch eine weitere Dialyse auf 50 mM gesenkt und die Probe auf zwei hintereinander geschalteten 5 ml HiTrap™ QXL Säulen aufgetragen. Als Bindungspuffer wurde 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl und als Elutionspuffer 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 M NaCl verwendet. Die Elution erfolgte

durch einen Stufengradienten mit den Stufen 10 % (5 CV), 20 % (5 CV), 30 % (5 CV), 50 % (4 CV), 100 % (4 CV).

### 3.28 Anzucht von *P. pastoris*

*P. pastoris* Zellen wurden in YPD Medium bei 30 °C und 220 rpm in einem Schüttelinkubator angezogen. Da transformierte Vektoren in das Genom von *P. pastoris* inseriert werden und von dort stabil an alle Tochterzellen weitergegeben werden, ist es, nach einer initialen Selektion positiver Klone, nicht nötig während allen Stufen der Hefeanzucht den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten. Die Selektion von pPIC9K-Vektoren erfolgte durch die Kultivierung auf Minimalmedium, da der in dieser Arbeit verwendete Expressionsstamm GS115 Histidin-auxotroph ist (Kap. 3.1). Diese Auxotrophie wird durch das sich auf den pPIC9K-Konstrukten befindliche *HIS4*-Gen kompensiert.

### 3.29 Glycerin-Dauerkulturen von *P. pastoris* Klonen

Zur Anfertigung von Glycerin-Dauerkulturen wurden *P. pastoris* Einzelkolonien von Agarplatten gepickt und in 10 ml YPD Medium resuspendiert. Die Kulturen wurden bei 30 °C und 220 rpm für mind. 36 h geschüttelt. Sobald eine  $OD_{600} > 15$  erreicht war, wurden in 2 ml Kryogefäßen (Nunc CryoTube™ Vials, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) jeweils 1,5 ml Hefekultur mit 350 µl 87 % Glycerin vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach einigen Minuten wurden die Gefäße in eine -80 °C Gefriertruhe überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.30 *In vivo* Selektion von *P. pastoris* Klonen mit multiplen Plasmidinsertionen

*P. pastoris* Transformanten wurden wie in Kap. 3.12 beschrieben auf MD-Agarplatten ausplattiert. Um Klone zu identifizieren, die mehr als ein Plasmid-Insert enthalten wurden die Kolonien von den MD-Agarplatten auf YPD-Agarplatten (Kap. 3.4.2) mit Geneticin übergeimpft. Klone mit multiplen Insertionen von pPIC9K-Konstrukten zeichnen sich durch ihre Resistenz gegen selbst hohe Konzentrationen dieses Antibiotikums aus. Da nur bei etwa 1 % – 10 % der Transformanten solche Mehrfachinsertionen auftreten müssen sehr viele Klone getestet werden.

Um dies zu erreichen, wurden vier MD-Platten mit Transformanten (> 500 Kolonien pro Platte) verwendet. 2 ml steriles Wasser wurde über die Einzelkolonien der MD-Platten pipettiert und mit

einem Spatel so verteilt, dass die Hefezellen suspendiert werden. Die Zellsuspension wurde abgenommen und ihre Zelldichte durch Absorptionsmessung bei 600 nm bestimmt ( $1 \text{ OD}_{600} = 5 \times 10^7$  Zellen/ml). Es wurden jeweils  $10^6$  Zellen auf YPD-Agarplatten mit den Geneticin-Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,75 mg/ml und 3 mg/ml ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert bis nach 3 – 5 Tagen (je nach Geneticin-Konzentration) Kolonien sichtbar waren. Von allen YPD-Platten wurden Einzelkolonien ausgewählt und auf neue YPD-Platten mit den gleichen Geneticin-Konzentrationen ausgestrichen um falsch-positive Klone zu identifizieren. Klone, die auch auf den neuen Platten innerhalb von 3 – 5 Tagen Kolonien bildeten, wurden für die weitere Analyse ausgewählt.

### 3.31 Selektion von Klonen mit dem Methanol-Abbau-Phänotyp $\text{Mut}^+$

Aufgrund der zelleigenen Alkohol-Oxidase AOX1 können GS115-Hefezellen auch in Medium wachsen, das Methanol als einzige Kohlenstoffquelle enthält. Dieser wildtypische Wachstumsphänotyp wird als  $\text{Mut}^+$  bezeichnet.

Da bei der Insertion der pPIC9K-Konstrukte ins Hefegenom in seltenen Fällen der AOX1-Promotor zerstört wird und die Klone die Fähigkeit zum Wachstum auf Methanol als einziger Kohlenstoffquelle verlieren ( $\text{Mut}^S$ -Phänotyp), wurden die identifizierten Multi-Kopien-Klone (Kap. 3.30) auf ihren Wachstumsphänotyp hin analysiert. Die zu untersuchenden Klone wurden jeweils gleichzeitig auf Agarplatten mit Minimal-Dextrose-Medium (MD) und Minimal-Methanol-Medium (MM) ausplattiert. Die Agarplatten wurden anschließend für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Diejenigen Kolonien, die sowohl auf den MD- als auch auf den MM-Platten normal gewachsen sind, können als  $\text{Mut}^+$ -Klone identifiziert werden.  $\text{Mut}^S$ -Transformanten wachsen normal auf den MD-Platten aber kaum auf den MM-Platten.

Für alle weiteren Expressionstests und Zellanzuchten wurden lediglich Klone des  $\text{Mut}^+$ -Phänotyps verwendet.

### 3.32 Expressionstests von *P. pastoris* in Schüttelkulturen

Mit den *P. pastoris* GS115 pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis  $\text{Mut}^+$ -Klonen, die auf Medium mit der höchsten getesteten Geneticin-Konzentration (3 mg/ml) wachsen können, wurden Expressionstests durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde *P. pastoris* GS115 pPIC9K verwendet. Die Klone wurden als Einzelkolonien auf Nähragarplatten gepickt, in 10 ml YPD Flüssigmedium resuspendiert und für

24 h bei 30 °C und 230 rpm geschüttelt. Von diesen Kulturen wurden jeweils 100 µl verwendet um 25 ml BMGY-Kulturen zu inokulieren. Diese wurden bei 30 °C und 220 rpm geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 6 erreicht war. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1500 × g, 4 °C) und in jeweils 100 ml BMMY-Medium resuspendiert. Die Kulturen wurden für insgesamt 4 Tage bei 30 °C und 220 rpm geschüttelt. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden den Kulturen jeweils 0,4 ml 100 % Methanol zugesetzt sowie je 1 ml Proben gezogen. Die Proben wurden abzentrifugiert und die Überstände und Zellpellets durch SDS-PAGE (Kap. 3.10.2) und Western Blot (Kap. 3.10.3) auf die Expression des Zielproteins hin analysiert.

### 3.33 Fermentation von *P. pastoris*

Die Fermentation von *P. pastoris* erfolgte in einem Biostat® B Fermentationssystem mit einem 10 l Kulturgefäß. Die Fermentation wurde mit einem Ausgangsvolumen von 5 l Fermentationsmedium durchgeführt, wobei während der Fermentation die Kohlenstoff- (Glycerin bzw. Methanol) sowie Stickstoffquellen (Ammoniak) zugefüttert wurden, so dass am Ende der Fermentation ein Volumen von etwa 8 l erreicht war.

Eine Einzelkolonie von *P. pastoris* GS115 pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis wurde in 10 ml YPD-Medium für 24 h bei 30 °C und 220 rpm im Schüttelkolben angezogen. Danach wurden mit 100 µl dieser Kultur 250 ml BMGY inokuliert und für etwa 16 h bei 30 °C und 220 rpm Schütteln in einem 1 l Schüttelkolben inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 5,5 erreicht war. Mit dieser Starterkultur wurde der Fermenter angeimpft. Das Fermentationsmedium enthielt 100 mM Kaliumphosphat, pH 6,0, 2 % Pepton (w/v), 1 % Caseinhydrolysat (w/v), 1 % Hefeextrakt (w/v) und 4 % Glycerol (w/v). 100 µg/ml Ampicillin wurden zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 6 eingestellt und während der Fermentation alle 12 h kontrolliert und evtl. durch Zugabe von 25 % NH<sub>3</sub> (w/v) nachgestellt. Die Schaumentwicklung im Fermenter wurde durch regelmäßige tropfenweise Zugabe einer 10 % Schaumverhüter-Lösung (Antifoam Y-30, Sigma-Aldrich, Steinheim) gehemmt. Der im Medium gelöste Sauerstoff wurde durch eine pO<sub>2</sub>-Elektrode (Mettler Toledo GmbH, Gießen) kontinuierlich gemessen. Die Kultur wurde mit 800 rpm gerührt und mit 10 l/min Luft begast, bis das im Medium enthaltene Glycerol von den Zellen verbraucht wurde. Dies war nach 20,5 h der Fall und äußerte sich in einem rapiden Anstieg des im Medium gelösten Sauerstoffs bis auf 100 %. An diesem Punkt wurde der Kultur für eine Dauer von 9 h mit einer Rate von 1,5 ml/min eine Glycerol-Lösung (50 % Glycerol (w/v), 1,2 % PTM1-Spurenelemente (v/v)) zugefüttert. 2 h vor dem Ende der Glycerol-Fütterung wurden dem

Fermentationsmedium außerdem noch 10 ml Methanol zugesetzt um die Expression von Enzymen zu dessen Metabolisierung zu induzieren. Nach dem Ende der Glycerol-Fütterung wurde 1 h gewartet, bis das im Medium enthaltene Glycerol verbraucht war, was wiederum am Anstieg des O<sub>2</sub>-Signals erkennbar war. Dann wurde der Kultur mit einer Rate von 0,2 ml/min Methanol (98,8 % Methanol (v/v), 1,2 % PTM1-Spurenelemente (v/v)) zugefüttert, was die Expression des Zielproteins induziert. Die Zelldichte der Kultur hatte zu diesem Zeitpunkt einen Wert von 185 mg/ml Nasszellgewicht. Die Fermentation wurde 4 Tage und 8 Stunden nach dem Beginn der Methanol-Fütterung beendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 5500 × g, 4 °C) und bei -20 °C aufbewahrt. Der Überstand der Zentrifugation wurde bei 4 °C gerührt. Durch tropfenweise Zugabe von 1 M NaOH unter Rühren wurde der pH des Zellüberstands auf einen Wert von 7,5 gebracht.

### **3.34 Expression von rekombinanten Proteinen in COS-7 und HEK 293T**

#### **3.34.1 Zellanzucht**

COS-7 Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Missler (Universität Münster) und HEK 293T Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Clemens Steegborn (Universität Bayreuth) erhalten. Beide Zelllinien wurden in 250 ml Kulturflaschen mit DMEM Medium, das 10 % Fetales Rinderserum (FBS) und 1 % Pencillin-Streptomycin-Lösung (PS) enthielt, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung angezogen. Jeweils zwei Tage nach dem Animpfen waren die Kulturflaschen mit konfluenten Zellmonolayern bewachsen. Bei der Subkultur der Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt, die Zellen dann mit 10 ml vorgewärmten PBS (37 °C) pro Kulturflasche gewaschen und mit 1 ml einer Lösung von 0,26 % Trypsin und 0,02 % EDTA behandelt. Die Zellen wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis sie von der Gefäßwand abgelöst waren. Dann wurden sie in 40 ml DMEM, 10 % FBS, 1 % PS resuspendiert und in vier neue 250 ml Kulturflaschen überführt.

#### **3.34.2 Transfektion und Proteinexpression**

Zur Vorbereitung der Proteinexpression wurden die Zellen gesplittet, mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend in 10 cm Petrischalen mit je 10 ml Medium resuspendiert. Eine Petrischale wurde dabei mit  $5 \times 10^5$  COS-7 Zellen oder mit  $1,4 \times 10^6$  HEK 293T Zellen



angepflegt. Die angimpften Zellen wurden für 18 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und dann transfiziert.

#### *DEAE-Dextran Methode*

COS-7 Zellen wurden mit der Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran Methode transfiziert. Dabei wurde das Medium der Petrischalen abgesaugt und die Zellen in 6 ml 1 × TBS (50 mM Tris/HCl, pH 8,4; 150 mM NaCl) pro Schale gewaschen. Dann wurden zu jeder Petrischale 3,3 ml Transfektionsmix (6,6 µg DNA, 100 mg DEAE-Dextran, 1 × TBS) pipettiert und die Zellen 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DMEM, 10 % FBS, 1 % PS und 100 µM Chloroquine überschichtet. Die Zellen wurden für 3 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, dann wurde das Medium abgesaugt und 10 ml DMEM, 10 % FBS, 1 % PS zugegeben. Nach 14 h wurde das Medium gegen DMEM, 1 % PS ausgetauscht, da das fetale Rinderserum IgGs enthält, welche die Proteinreinigung stören.

#### *Calciumphosphatmethode*

HEK 293T Zellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphatmethode transfiziert. Dazu wurden 8,4 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl mit 685 µl 250 mM CaCl<sub>2</sub> und 700 µl 2 × Transfektionspuffer (274 mM NaCl, 40 mM HEPES, 12 mM Glukose, 10 mM KCl, 1,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend auf eine Petrischale mit etwa 50 % konfluenten HEK 293T Zellen geträufelt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert bis am nächsten Morgen das Medium gewechselt wurde und, wie bei den COS-7 Zellen beschrieben, FBS aus dem Wachstumsmedium entfernt wurde. Bei der Proteinexpression ohne N-Glykosylierungen enthielt das Medium zusätzliche noch 2,5 µg/ml Tunicamycin.

Nach Transfektion der Säugerzellen wurden diese für drei Tage ohne Medienwechsel bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand abgenommen, in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### **3.34.3 Reinigung von sekretiertem Protein aus dem Kulturüberstand**

Zur Reinigung von ECD-GC-C-Thr-IgG aus dem Überstand der Zellkulturen wurden Protein A Sepharose Beads verwendet. Zuerst wurden etwa 600 µl der Beads-Lösung

entnommen und durch wiederholte Zentrifugation (1 min,  $12000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) und Resuspension in 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl äquilibriert. Zuletzt wurden die Beads in 400  $\mu\text{l}$  des Puffers resuspendiert. Die Zellkulturüberstände wurden in 50 ml Greinergefäßen aufbewahrt mit 100  $\mu\text{l}$  Beads pro 45 ml Medium versetzt. Dann wurden die Ansätze für 3 h bei  $4^\circ\text{C}$  im Kühlraum in einem *end-over-end*-Inkubator aufbewahrt. Die Greiner mit dem Medium und den Beads wurden schließlich abzentrifugiert (10 min,  $5500 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) und die Überstände bis auf etwa 0,5 ml pro Gefäß abgenommen. Die Beads wurden aufgeschlämmt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Durch erneute Zentrifugation (1 min,  $12000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) wurden die Überstände schließlich vollständig entfernt. Schließlich wurden die Beads durch dreimaliges Resuspendieren in 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl und Zentrifugieren gewaschen.

#### 3.34.4 Thrombin-Spaltung

Zur Spaltung des an die Protein A Sepharose gebundenen Fusionsproteins wurden die Beads in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß in 20 mM Tris/HCl, pH 8,4, 150 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  gewaschen und in einem Volumen von 1 ml resuspendiert. Dann wurde 2  $\mu\text{l}$  Thrombin (2,4 U) zugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur über Nacht (16 h) geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Beads vom Überstand durch Zentrifugation (5 min,  $12000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) getrennt.

#### 3.35 Größenausschluss-Chromatographie

Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von MiniGC-C und NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C sowie zum Nachweis einer evtl. vorliegenden Oligomerisierung wurde eine Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt. Dazu wurden eine Superdex<sup>TM</sup> 75 (MiniGC-C) Säule sowie zwei hintereinander geschaltete Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL (NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C) Säulen sowie ein ÄKTA *purifier* FPLC-System verwendet (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg). Die Flussrate war in beiden Fällen 0,5 ml/min und als Flussmittel diente 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM NaCl. Als Referenzproteine für die Molekulargewichtsbestimmung dienten Ferritin (MW = 440000 Da), Transthyretin (MW = 63500 Da), Ovalbumin (MW = 44000 Da), Chymotrypsinogen (MW = 25000 Da) und Ribonuklease A (MW = 13700 Da) aus dem *Gel Filtration Calibration Kit LMW & HMW* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg). Das Totvolumen der Säulen wurde durch

die Verwendung von Blue Dextran bestimmt. Für jeden Lauf wurden etwa 500 µg Protein in einem Volumen von 100 µl eingesetzt. Die säulenspezifische Konstante  $K_{av}$ , die ein Maß für das einem Protein gegebener Größe zur Verfügung stehende Volumen ist, kann durch Gleichung 4.1 berechnet werden:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (\text{Gleichung 4.1})$$

Da  $K_{av}$  in linearer Beziehung zum dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts  $\log(\text{MW})$  steht, kann aus den Elutionsläufen der Referenzproteine eine Eichgerade bestimmt werden, aus der sich das Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins ergibt.

### 3.36 Massenspektrometrie

Elektronenspray-Ionisations (ESI) – LC-Massenspektren wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Clemens Steegborn, Lehrstuhl Biochemie, Universität Bayreuth aufgenommen. Als Spektrometer diente ein LTQ XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Die Proben wurden durch eine 12 cm 100 µm ID kapillare Umkehrphasen-Säule (Reprosil C18 AQ, Dr. Maisch, Germany) und einem konstanten Gradient von 0 % bis 40 % Puffer B in 45 min (Puffer A: 0,1 % Ameisensäure; Puffer B: 70 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure) aufgetrennt.

Maldi-TOF-Massenspektren (engl.: *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight*) wurden an einem Autoflex<sup>TM</sup> (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) Spektrometer in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Cord-Michael Becker, Institut für Biochemie, Universität Erlangen-Nürnberg aufgenommen. Als Matrix wurde 2',5'-Dihydroxyacetophenon (DHAP) mit 0,1 % TFA verwendet.

Theoretische Protein- und Peptidmassen wurden mit Hilfe des Tools Protparam<sup>3</sup> und unter Berücksichtigung eventuell vorliegender Isotopenmarkierung errechnet.

Peptidmassen-Fingerprints (PMF) wurden durch die Zentrale Bioanalytik (ZBA) am Zentrum für Molekulare Medizin Köln durchgeführt.

### 3.37 CD-Spektroskopie

#### 3.37.1 Probenvorbereitung

Für die CD-Spektroskopie von MiniGC-C wurde die Konzentration der Probe bestimmt (Kap. 3.9)

3 <http://www.expasy.org/proteomics> (Stand: 06.09.2013)

und das Protein auf 5  $\mu\text{M}$  verdünnt. Als Messpuffer wurde 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,0 verwendet.

### 3.37.2 Messbedingungen

Zur Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren wurde ein JASCO J-810 Spektropolarimeter mit einem CDF-426S Peltier-Element (JASCO Germany GmbH, Gross-Umstadt) verwendet. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C in einer 1 mm Quarzküvette. Das CD-Signal wurde in einem Wellenlängenbereich von 260 – 190 nm aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer Bandbreite von 1 nm, einer Geschwindigkeit von 50 nm/min, einer Auflösung von 0,2 nm und einer Sensitivität von 100 mdeg im kontinuierlichen Modus gemessen. Es wurden 15 gemessene Einzelspektren akkumuliert und das Referenzspektrum des Puffers von den gemessenen Daten subtrahiert.

Aus der gemessenen Elliptizität  $\Theta$  wurde die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $[\Theta]_{\text{MRW}}$  nach folgender Gleichung (4.2) errechnet (Schmid, 1989):

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{100 \cdot \Theta}{c \cdot d \cdot N} \quad (\text{Gleichung 4.2})$$

c: Proteinkonzentration in mol/l; d: Schichtdicke der Messküvette in cm; N: Anzahl der Aminosäuren des Proteins;  $\Theta$ : Elliptizität;  $[\Theta]_{\text{MRW}}$ : mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure.

Zur Sekundärstrukturanalyse wurde der CDSSTR-Algorithmus (Johnson, 1999) mit dem Referenzset #5 verwendet. Die Analyse erfolgte durch den Internet-basierten Dienst DichroWeb<sup>4</sup>.

## 3.38 NMR-Spektroskopie

### 3.38.1 Probenvorbereitung

Zur Durchführung von NMR-Experimenten wurden die gereinigten Proteine gegen die geeigneten NMR-Puffer dialysiert und anschließend durch Vivaspin Konzentratoren (Vivaspin® 20, Sartorius AG, Göttingen) konzentriert. Prouroguanylin und Prouro-STh wurden in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,8, 10 % D<sub>2</sub>O (v/v), 0,04 % NaN<sub>3</sub> (w/v) analysiert. Der NMR-Puffer von MiniGC-C enthielt 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 % D<sub>2</sub>O (v/v), 0,04 % NaN<sub>3</sub> (w/v).

Die gereinigten Peptidliganden von GC-C wurden durch Vakuumzentrifugation getrocknet und

<sup>4</sup> <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml> (Stand: 06.09.2013)

dann direkt in H<sub>2</sub>O, 10 % D<sub>2</sub>O (v/v), 0,04 % NaN<sub>3</sub> (w/v) gelöst. Die pH-Werte der Proben wurden durch Zugabe von 1 M HCl auf 3 (bei STh, STh L9Y und STh Y5R L9Y) bzw. 3,3 (bei Uroguanylin) eingestellt. Typische Ligandenkonzentrationen lagen bei etwa 100 µM.

NMR-Titrationsen zwischen den Peptidliganden und Fragmenten der ECD von GC-C wurden in 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 % D<sub>2</sub>O (v/v), 0,04 % NaN<sub>3</sub> (w/v) durchgeführt. Das Gesamtvolumen der NMR-Proben wurde auf 550 µl eingestellt und die Proben wurden in 5 mm Ultra-Präzisions NMR-Röhrchen (Norell, Landisville, NJ, USA) gefüllt.

### 3.38.2 Allgemeine Messbedingungen und Verfahren

NMR-Experimente wurden an Spektrometern der Firma Bruker (Karlsruhe) vom Typ Avance 400 (400 MHz), Avance 700 (700 MHz), Avance 800 (800 MHz), Avance II+ (600 Mhz) durchgeführt. Die Avance 400 und Avance II+ Spektrometer sind mit inversen TXI-<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-Tripelresonanz-Probenköpfen ausgestattet während in den Avance 700 und Avance 800 Spektrometern inverse TCI-<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-Tripelresonanz-Kryoprobenköpfe verwendet werden. Alle Probenköpfe enthalten eine aktiv abgeschirmte z-Gradientenspule. Die Temperatur der Probe wurde über BVT3000 Einheiten (Bruker, Karlsruhe) reguliert und betrug 25 °C bei Experimenten mit Prouroguanylin, ProuroSTh, MiniGC-C und den NMR-Titrationsen, 11 °C bei Experimenten mit Uroguanylin und 10 °C bei NMR-Spektren von STh, STh L9Y und STh Y5R L9Y. Alle Spektren wurden phasensensitiv aufgenommen, die Quadraturdetektion in den indirekten Dimensionen erfolgte über die STATES-TPPI-Methode (States *et al.*, 1982; Marion *et al.*, 1989) oder das Echo/Antiecho-Verfahren, wenn gepulste Feldgradienten verwendet worden sind (Kay *et al.*, 1992; Schleucher *et al.*, 1994).

Die Unterdrückung des Wassersignals wurde entweder mit den Pulsfolgen 3-9-19 WATERGATE (Sklenar *et al.*, 1993) und W5 WATERGATE (Liu *et al.*, 1998) oder mit der DPFGE-Technik (engl. *double pulsed field gradient spin echo*) (Hwang & Shaka, 1995) erreicht. Bei den heteronuklearen Experimenten erfolgte die Entkopplung der Heterokerne während der Aufnahme des freien Induktionsabfalls (FID) durch die GARP-Sequenz (Shaka *et al.*, 1985), während zur Protonenentkopplung die WALTZ-16-Pulsfolge (Shaka *et al.*, 1983) eingesetzt wurde. Außerdem wurden gepulste Feldgradienten zur Kohärenzselektion und Artefaktunterdrückung verwendet (Schleucher *et al.*, 1994).

Zur Referenzierung der chemischen Verschiebungen von Protonen wurde der externe Standard 2,2-Dimethyl-2-silapent-5-sulfonsäure (DSS) verwendet. Die chemischen Verschiebungen von <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N wurden indirekt unter Verwendung der Verhältnisse der Nullpunktsfrequenzen ( $\omega_N/\omega_H =$

0,101329118;  $\omega_C/\omega_H = 0.251449530$ ) referenziert (Wishart *et al.*, 1995).

### 3.38.3 Prozessierung und Analyse von NMR-Spektren

Die Prozessierung der gemessenen NMR-Datensätze erfolgte mit am Lehrstuhl von Dr. Kristian Schweimer entwickelter Software (Schweimer *et al.*, 2000). Vor der Fouriertransformation wurden die gemessenen FIDs mit einer um  $\pi/3$  verschobenen Sinusquadrat-Fensterfunktion multipliziert. Die Anzahl der Datenpunkte in den einzelnen Frequenzdimensionen wurde durch sog. *zero-filling* (Cavanagh *et al.*, 2006) erhöht, um die digitale Auflösung zu verbessern. Bei dreidimensionalen Spektren wurde der FID vor der Fouriertransformation in der  $^{15}\text{N}$ -Dimension durch *linear prediction* (Barkhuijsen *et al.*, 1985) extrapoliert und durch *zero-filling* mindestens auf die doppelte Länge vergrößert.

Die Spektren wurden fouriertransformiert, und einer Phasenkorrektur nullter und erster Ordnung unterzogen. Schließlich erfolgte eine Korrektur der Basislinie in allen Dimensionen durch einen *model-free*-Algorithmus (Friedrich, 1995).

Die prozessierten NMR-Spektren wurden mit dem Programm NMRView 5.0.4 (Johnson & Blevins, 1994) visualisiert und ausgewertet.

### 3.38.4 Homonukleare Experimente

#### TOCSY-Experiment

Das TOCSY-Experiment (engl.: *total correlation spectroscopy*) ist eine Methode, um Konnektivitäten innerhalb des Spinsystems einer Aminosäure zu erhalten (Braunschweiler & Ernst, 1983; Bax & Davis, 1985) und beruht auf der Verwendung einer isotropen Mischsequenz, die den Magnetisierungstransfer zwischen zwei Spins über ihre starke skalare  $^3\text{J}$ -Kopplung vermittelt. Dieser sog. Hartmann-Hahn-Transfer (Cavanagh, 1992) vollzieht sich zwischen Protonen, die über jeweils drei kovalente Bindungen miteinander verbunden sind und kann innerhalb eines Spinsystems über mehrere Kopplungen weitergegeben werden. Da es in Peptidketten keine  $^3\text{J}$ -Kopplungen gibt, die über die Peptidbindung reichen, ist mit dem TOCSY-Experiment keine sequentielle Korrelation zwischen einzelnen Aminosäureresten möglich. Jedoch erlaubt es die Zuordnung aller Protonen zu einem Spinsystem und ermöglicht somit die Identifizierung der jeweiligen Aminosäuren anhand ihres spezifischen Signalmusters.

### NOESY-Experiment

Der sog. Kern-Overhauser-Effekt (engl.: *nuclear overhauser effect*, NOE) ist ein Phänomen, bei dem Magnetisierung von einem Kern durch dipolare Kreuzrelaxation auf einen räumlich benachbarten Kern übertragen wird (Anderson & Freeman, 1962). Da die Stärke des NOE umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands beider Kerne ist, können NOE-Korrelationssignale als Maß für die Distanzen zwischen den Protonen eines Moleküls genutzt werden (Cavanagh *et al.*, 2006).

Das NOESY-Experiment (engl.: *nuclear overhauser enhancement spectroscopy*) ist ein typischerweise zweidimensionales Experiment und erzeugt Korrelationssignale, die durch Kreuzrelaxation zwischen räumlich nahe beeinanderliegenden Protonen entstehen (Jeener *et al.*, 1979). Die Länge der Mischzeit, während der der Magnetisierungstransfer zwischen den Kernen erfolgt, bestimmt die Dauer der Kreuzrelaxation und damit die Intensität der Kreuzsignale. Bei längeren Mischzeiten kommt es jedoch verstärkt zur sog. Spindiffusion, d. h. dem Fluss der Magnetisierung über mehrere jeweils paarweise benachbarte Protonen. Da dabei unterschiedliche Intensitäten der Kreuzsignale teilweise herausgemittelt werden, führt dies zu einer möglicherweise fehlerhaften Einschätzung der Abstandsverhältnisse im untersuchten Molekül.

Bei Proteinen kann das NOESY-Experiment eingesetzt werden, um die sterischen und konformationellen Verhältnisse aufzuklären. Daneben eignet es sich bei Peptiden und kleineren Proteinen, in Verbindung mit dem TOCSY-Experiment, zur sequentiellen Zuordnung von Resonanzsignalen.

### 3.38.5 Heteronukleare Experimente

#### HSQC-Experiment

Das HSQC-Experiment (engl.: *heteronuclear single quantum coherence*) (Mueller, 1979; Bodenhausen & Ruben, 1980) gehört zu den grundlegendsten heteronuklearen Experimenten in der Protein-NMR-Spektroskopie. Es handelt sich dabei um ein Protonen-detektiertes, zweidimensionales Experiment, bei dem die Kohärenz von den anfänglich angeregten Protonen auf einen Heterokern ( $^{15}\text{N}$  oder  $^{13}\text{C}$ ) übertragen wird, wo sich die Magnetisierung unter dem Einfluss der chemischen Verschiebung entwickelt, bevor sie wieder auf die Protonen zurück übertragen und detektiert wird. Charakteristisch für das Experiment ist die Tatsache, dass die Magnetisierung während der indirekten Evolutionsperiode als Einzelquantenkohärenz vorliegt. Zum Transfer der Magnetisierung zwischen Protonen und Heterokernen wird die sog. INEPT-Sequenz (engl.:

*insensitive nuclei enhanced by polarization transfer*) (Morris & Freeman, 1979; Burum & Ernst, 1980) eingesetzt.

Ein gemessenes [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum ist zweidimensional mit einer Achse für die chemischen Verschiebungen von  $^1\text{H}$  und einer Achse für die chemischen Verschiebungen von  $^{15}\text{N}$ . Im Spektrum korrelieren die detektierten Signale die Verschiebungen von  $^{15}\text{N}$ -Kernen und ihren kovalent gebundenen Protonen. Bei Proteinen gilt das [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum als „Fingerabdruck“, da die Signale der Rückgratamidgruppen jedes Proteins in einem spezifischen Muster angeordnet sind. Im HSQC wird für jede Aminosäure ein Rückgrat-Signal, sowie evtl. noch Seitenkettensignale, erwartet. Die Ausnahme bildet Prolin, das aufgrund der Ringstruktur seiner Seitenkette keine Amidgruppe besitzt und im Spektrum nicht auftaucht.

Die in einem [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum enthaltene Information ist äußerst nützlich, da sie u. a. Aussagen darüber zulässt, ob ein Protein gefaltet ist. Außerdem wird das HSQC-Experiment bei NMR-Bindungsstudien eingesetzt und dient als Grundlage für viele mehrdimensionale (3D und 4D) NMR-Experimente.

In dieser Arbeit wurde routinemäßig das sog. FHSQC-Schema eingesetzt (Mori *et al.*, 1995).

### **[ $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ ]-TOCSY-HSQC und [ $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ ]-NOESY-HSQC**

Bei größeren Proteinen kann die Auswertung von TOCSY- und NOESY-Experimenten durch Signalüberlagerungen deutlich erschwert werden. In diesen Fällen ist es wünschenswert, die in beiden Spektren enthaltenen Resonanzsignale entlang einer zusätzlichen Dimension aufzutrennen. Bei den [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-TOCSY-HSQC- und [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-NOESY-HSQC-Experimenten wird die Information aus den beiden homonuklearen Spektren durch die [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-Korrelation editiert (Gronenborn *et al.*, 1989; Talluri & Wagner, 1996).

Neben der Vereinfachung von NOESY- und TOCSY-Spektren erlauben die dreidimensionalen Experimente die eindeutige sequentielle Zuordnung der Signale des [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrums.

### **3.38.6 Aufnahmeparameter der in dieser Arbeit gemessenen NMR-Experimente**

Nachfolgend sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten NMR-Experimente sowie die Aufnahmeparameter aufgeführt (Tab. 3.6). Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Pulsprogramme wurden von Dr. Kristian Schweimer (Lehrstuhl Biopolymere, Universität Bayreuth) geschrieben.



Tab. 3.6: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen NMR-Spektren und ihrer Aufnahmeparameter.

Experiment	Puls-programm	NS	SF0 (MHz)	Dim	Kern	SW (Hz)	TD	Protein/Peptid	siehe
$[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC	fhsqcN15.ks	16	700,2	F1	$^{15}\text{N}$	1667,5	256	Prouroguanylin Prouro-STh	Abb. 4.6 Abb. 4.16
				F2	$^1\text{H}$	9765,6	1024		
$[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC	fhsqcN15.ks	16	700,2	F1	$^{15}\text{N}$	1774,0	256	Uroguanylin STh	Abb. 4.10 Abb. 4.19 B Abb. 4.35 B
				F2	$^1\text{H}$	9124,1	1024		
$[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC	fhsqcN15.ks	16	700,2	F1	$^{15}\text{N}$	1206,3	256	STh L9Y STh Y5R L9Y	Abb. 4.25 A Abb. 4.25 B
				F2	$^1\text{H}$	9124,1	1024		
$[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC	fhsqcN15.ks	32	700,2	F1	$^{15}\text{N}$	1667,5	256	MiniGC-C	Abb. 4.33
				F2	$^1\text{H}$	9765,6	1024		
$[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC	fhsqcN15.ks	64	800,1	F1	$^{15}\text{N}$	2270,4	256	MiniGC-C	Abb. 4.34 A
				F2	$^1\text{H}$	9615,4	1024		
$[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC	fhsqcN15.ks	16	600,2	F1	$^{15}\text{N}$	1581,5	256	Uroguanylin MiniGC-C	Abb. 4.34 B Abb. 4.35 A
				F2	$^1\text{H}$	8417,5	1024		
$[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC	fhsqcN15.ks	16	800,1	F1	$^{15}\text{N}$	1621,7	256	Uroguanylin	Abb. 4.41
				F2	$^1\text{H}$	11160,7	1024		
$[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY Mischzeit: 300 ms	noesyw5.ks	16	800,1	F1	$^1\text{H}$	9601,5	512	Uroguanylin	Abb. 4.9
				F2	$^1\text{H}$	10416,7	4096		
$[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -TOCSY	dipsidpfgse.ks	16	600,2	F1	$^1\text{H}$	7812,5	768	Uroguanylin	-
				F2	$^1\text{H}$	7812,5	4096		
$[^1\text{H}, ^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ - NOESY-HSQC Mischzeit: 300 ms	n15noesy.ks	16	700,2	F1	$^{15}\text{N}$	1774,0	64	STh	Abb. 4.19 A
				F2	$^1\text{H}$	9103,3	256		
				F3	$^1\text{H}$	9765,6	1024		
$[^1\text{H}, ^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ - TOCSY-HSQC	n15tocsy.ks	16	800,1	F1	$^{15}\text{N}$	2108,3	32	STh	-
				F2	$^1\text{H}$	9601,5	196		
				F3	$^1\text{H}$	11160,7	1024		

NS: Anzahl der akkumulierten FIDs (engl.: number of scans); SF0: Trägerfrequenz des Protonenkanals; Dim: Dimension; SW: Breite des spektralen Fensters in der jeweiligen Dimension (engl: sweep width); TD: Anzahl der gemessenen komplexen Datenpunkte (engl: time domain).

### 3.38.7 Homonukleare Zuordnung

Für die Zuordnung von Resonanzsignalen in NMR-Spektren zu den entsprechenden Nuklei im untersuchten Peptid oder Protein können drei verschiedene Arten von durch NMR-Spektroskopie erhältlichen Informationen berücksichtigt werden (Cavanagh *et al.*, 2006):

- Interaktionen über kovalente Bindungen hinweg, vermittelt durch skalare Kopplungen
- Wechselwirkungen über den freien Raum hinweg, vermittelt über dipolare Kopplungen
- die chemisch-magnetische Umgebung der jeweiligen Nuklei, die sich in der chemischen Verschiebung niederschlägt.

Diese Informationen können durch eine Reihe von Zuordnungsstrategien erhalten werden. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Peptiden wurden homonukleare Experimente (TOCSY und NOESY) zur sequentiellen Zuordnung der Protonen verwendet. Die Zuordnung erfolgte unter Verwendung unmarkierter Proben. Zur Übertragung auf die Signale des [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrums und damit zur Identifizierung der chemischen Verschiebungen der Rückgrat-Stickstoffatome wurden [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-TOCSY-HSQC- und [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-NOESY-HSQC-Experimente mit  $^{15}\text{N}$ -markierten Peptidproben durchgeführt.

Die homonukleare Zuordnung wurde nach der von Wüthrich *et al.* entwickelten Strategie durchgeführt (Wüthrich, 1986). Skalare Korrelationen, die durch COSY und TOCSY erhalten werden können, sind immer auf Protonen beschränkt, die innerhalb eines Spinsystems, d. h. eines Aminosäurerests, vorliegen. Dies liegt darin begründet, dass die  $^4J_{\text{HH}}$ -Kopplungen, die für eine Korrelation über die Peptidbindung hinweg erforderlich wären, zu klein sind. Skalare Korrelationsexperimente werden benutzt, um die Protonenresonanzen innerhalb jedes Spinsystems zuzuordnen.

Die durch das NOESY-Experiment erhaltenen abstandsabhängigen Korrelationen können dazu verwendet werden, die einzelnen Spinsysteme sequentiell zu verbinden. Zwar enthalten NOESY-Spektren auch Kreuzsignale zwischen Protonen, die in der Peptidsequenz weit voneinander entfernt sind, jedoch ist eine Mehrheit der Signale zwischen verschiedenen Aminosäuren auf deren sequentielle Nachbarschaft zurückzuführen. So sind insbesondere zwischen dem  $^1\text{H}_{\text{N}}$  einer Aminosäure  $i+1$  und den  $^1\text{H}_{\text{N}}$ ,  $^1\text{H}_{\alpha}$  und  $^1\text{H}_{\beta}$  der jeweiligen Vorgängeraminosäure  $i$  oftmals intensive NOESY-Kreuzsignale zu beobachten. Diese Information dient dazu, die jeweiligen Spinsysteme in die richtige sequentielle Reihenfolge zu bringen. Aminosäure-spezifische chemische Verschiebungen einzelner Protonen erlauben es schließlich, eine Abfolge von auf diese Weise verknüpften Spinsystemen dem jeweils passenden Abschnitt der Peptid- bzw. Proteinsequenz zuzuordnen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Rekombinante Expression und Charakterisierung von humanem Uroguanylin

#### 4.1.1 Reinigungsstrategie für rekombinantes Uroguanylin

Thomas Lauber hat im Rahmen seiner Dissertation gezeigt, dass sich humanes Proguanylin in *E. coli* in guter Ausbeute exprimieren lässt und dass aus dem rekombinanten Proguanylin das aktive Hormon Guanylin durch saure Hydrolyse freigesetzt werden kann (Lauber, 2003). Die rekombinante Herstellung von Uroguanylin hat sich aber als schwierig erwiesen. Zwar gelang die Expression und Reinigung von Prouroguanylin. Jedoch konnte Uroguanylin nicht in für strukturbiochemische Studien ausreichender Menge und Reinheit aus dem Prohormon freigesetzt werden (Schuster, 2004). Eine alternative Reinigungsstrategie, bei der die enzymatische Spaltung von Prouroguanylin zum aktiven Hormon durch das Einfügen der Erkennungssequenz von TEV-Protease zwischen Proregion und Hormon begünstigt werden sollte, führte ebenfalls nicht zur Isolierung aktiven Uroguanylins (Leo, 2009). Zu Beginn dieser Arbeit war kein Verfahren verfügbar, um Uroguanylin in für NMR-Studien ausreichender Ausbeute und Reinheit rekombinant darzustellen.

Das in dieser Arbeit zur Herstellung von Uroguanylin verwendete Plasmid wird mit pET32a-Asp-pres-prouroguanylin bezeichnet (siehe Anhang, Kap. 10.1.1). Es kodiert für ein Fusionsprotein, welches neben dem C-terminalen Prouroguanylin aus einem N-terminalen Thioredoxin-Löslichkeitsanhang (Trx) und einer 46 Aminosäuren langen Verbindungsregion, die einen Hexahistidin-Reinigungsanhang enthält, besteht. Der Hexahistidinanhang erlaubt die einfache Reinigung des Fusionsproteins durch immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC). Schnittstellen für Thrombin und PreScission-Protease erlauben die Abspaltung der Fusionspartner von Prouroguanylin. Für die Ausbildung der nativen Struktur von Prouroguanylin ist es essentiell, dass sich Disulfidbrückenbindung sowohl in der Hormonregion als auch innerhalb der Proregion ausbilden können. Um dies zu ermöglichen wurde pET32a-Asp-pres-prouroguanylin in *E. coli* Origami B (DE3) exprimiert. Dieser Stamm exprimiert weder Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) noch Glutathion-Oxidoreduktase (*gor*) und zeichnet sich deswegen durch ein oxidatives Cytoplasma aus, in dem die Bildung von Disulfidbrücken begünstigt wird. Gegenüber anderen Bakterienstämmen mit oxidativem Cytoplasma, wie AD494 (DE3) oder Origami (DE3), zeigt Origami B (DE3) ein verbessertes Wachstum v. a. in Minimalmedium, so dass höhere Zelldichten erreicht werden können.

### 4.1.2 Expression in *E. coli* Origami B (DE3)

Das Plasmid pET32a-Asp-pres-prouroguanylin wurde durch Elektroporation in *E. coli* Origami B (DE3) eingeführt und positive Transformanten wurde auf LB-Agar mit Ampicillin als Selektionsmittel identifiziert. Zur Selektion der chromosomalen Mutationen in den Genen *trxB* und *gor* enthielt das Medium noch die Antibiotika Kanamycin und Tetracyclin. In den Flüssigkulturen wurde auf Kanamycin und Tetracyclin, nicht aber auf Ampicillin verzichtet, da chromosomale Gene wesentlich stabiler als plasmidkodierte Gene sind und sich gezeigt hat, dass insbesondere in Gegenwart von Tetracyclin deutlich geringere Zelldichten erreicht werden.

Nach der Transformation wurden Einzelkolonien verwendet um LB-Vorkulturen anzupflanzen. Mit diesen wurde die Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,15 – 0,25 angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C auf eine OD<sub>600</sub> von 0,7 herangezogen und die Induktion erfolgte mit IPTG. Nach 5 Stunden war die Expression abgeschlossen und die Zellen wurden geerntet (siehe Kap. 3.17). Die Expression wurde mit SDS-PAGE überprüft, indem Zellproben vor und nach der Induktion auf ein 19%iges Gel aufgetragen wurden (Abb. 4.1).

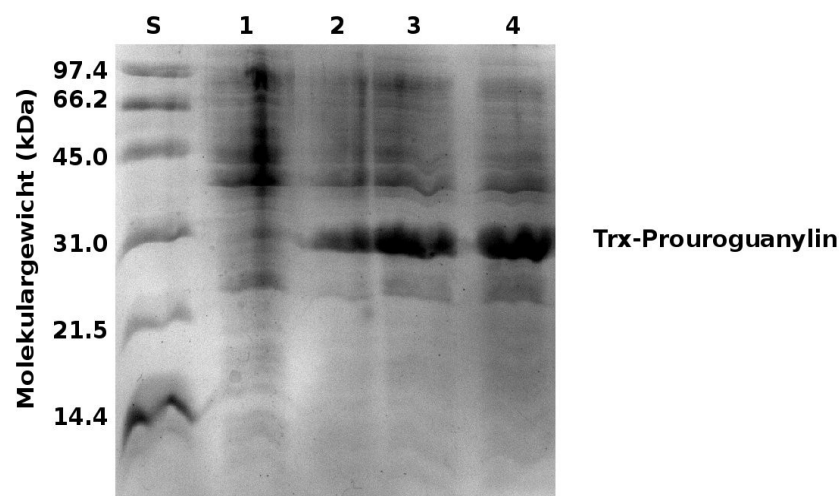


Abb. 4.1: Expression von Trx-Prouroguanylin in *E. coli* Origami B (DE3). Die Anzucht erfolgte unmarkiert in LB-Medium. Zellproben wurden auf ein 19 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. S: low range Proteinstandard; 1: Zellpellet vor Induktion; 2: 1 h nach Induktion; 3: 3 h nach Induktion; 4: 5 h nach Induktion.

Auf dem Gel ist deutlich die Intensitätszunahme einer Bande bei etwa 29 kDa zu beobachten. Diese entspricht dem Fusionsprotein Trx-Prouroguanylin, welches eine theoretische Masse von 27,3 kDa hat. Die Intensität der Bande zum Zeitpunkt der letzten Probenentnahme (Abb. 4.1, Bahn 4) zeigt, dass das verwendete Plasmid eine hohe Expressionsrate in Origami B (DE3) Zellen hat.

### 4.1.3 Reinigung von rekombinantem Prouroguanylin

#### 4.1.3.1 Zellaufschluss und Reinigung des Fusionsproteins Trx-Prouroguanylin

Die nach der Expression geernteten Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert und mit Hilfe eines Microfluidizers aufgeschlossen (siehe Kap. 3.18). Während der Zelllyse wurde das Auftreten großer Mengen präzipitierten Proteins beobachtet. Nur ein relativ kleiner Anteil des Fusionsproteins kann im Rohextrakt der Lyse gefunden werden, während der größte Teil als unlöslicher Bestandteil des Lysepellets vorliegt. Um den Anteil an löslichem Trx-Prouroguanylin zu erhöhen wurde das Lysepellet in einem Extraktionspuffer mit 4 M Harnstoff resuspendiert. Durch Zentrifugation wurden Zellbestandteile, die noch immer unlöslich waren, entfernt. Die gelelektrophoretische Analyse zeigt, dass durch den Harnstoff der Hauptanteil des Fusionsproteins solubilisiert werden konnte. In der unlöslichen Fraktion ist das Fusionsprotein nur noch als dünne Bande zu beobachten (Abb. 4.2, Bahnen 2 und 3).

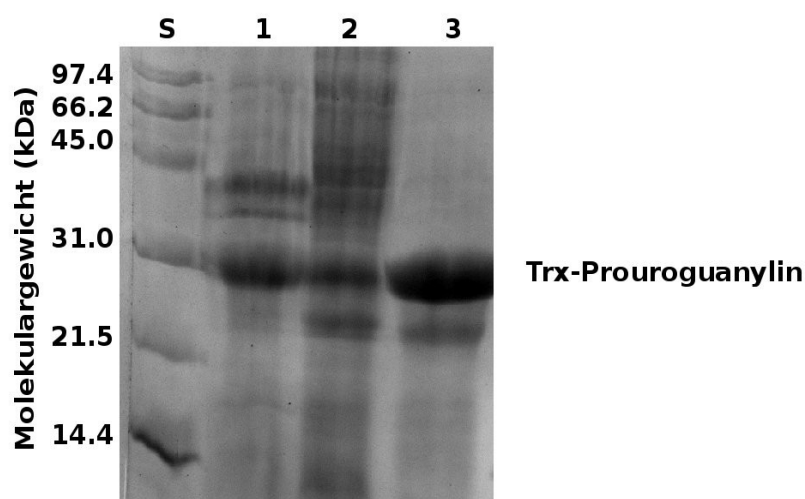


Abb. 4.2: Lyse der Zellen und Harnstoffextraktion von Trx-Prouroguanylin. Proben wurden auf ein 19 % SDS-Gel aufgetragen. S: low range Proteinstandard; 1: Überstand nach Lyse; 2: Pellet nach Harnstoffextraktion; 3: Überstand nach Harnstoffextraktion.

Der Überstand der Harnstoffextraktion wurde im Verhältnis 1:1 mit Bindungspuffer der Cobaltionen-Chromatographie verdünnt um die Konzentration an Harnstoff zu verringern und das Fusionsprotein zurückzufalten. Aus diesem Extrakt wurde Trx-Prouroguanylin durch Cobaltionen-Affinitätschromatographie isoliert (Abb. 4.3). Die Proteinlösung wurde auf eine mit  $\text{CoCl}_2$  beladene und in Bindungspuffer äquilibrierte HiPrep<sup>TM</sup> IMAC FF 16/10 Säule mit einem Bettvolumen von 20 ml aufgetragen. Dabei wurde  $\text{Co}^{2+}$  als immobilisiertes Metallion gewählt, da es im Vergleich zu  $\text{Ni}^{2+}$  weniger unspezifische Proteine bindet. Die Elution erfolgte in einem Stufengradienten mit einem

Elutionspuffer, der 1 M Imidazol enthielt. Die Affinitätschromatographie wurde durch SDS-PAGE analysiert.

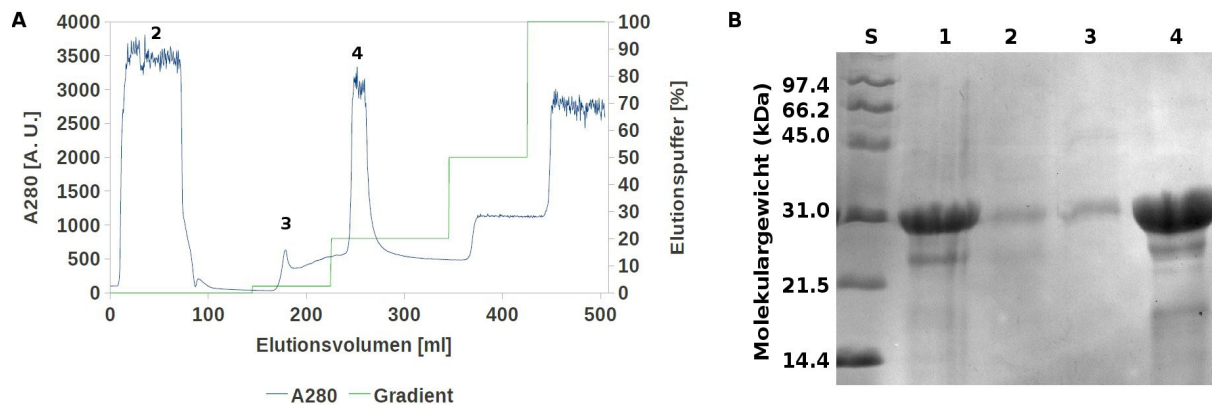


Abb. 4.3: Cobaltionen-Affinitätschromatographie von Trx-Prouroguanylin. Aufgetragen wurde der Harnstoffextrakt. Der verwendete Elutionspuffer enthielt 1 M Imidazol. A) Chromatogramm. B) 19 % SDS-Gel. S: low range Proteinstandard; 1: auf die Säule aufgetragener Harnstoffextrakt; 2: Säulendurchfluss; 3: Elutionsfraktion bei 25 mM Imidazol; 4: Elutionsfraktion bei 200 mM Imidazol.

Bei einer Imidazolkonzentration von 200 mM wird Trx-Prouroguanylin von der Säule gewaschen. Die eluierte Fraktion, die das Fusionsprotein in einer Reinheit von über 90 % enthielt, wurde anschließend dialysiert.

#### 4.1.3.2 Spaltung des Fusionsproteins mit PreScission-Protease

Das gereinigte Trx-Prouroguanylin wurde zur Abspaltung des Thioredoxin- und Hexahistidinanhangs mit PreScission-Protease behandelt (siehe Kap. 3.19.1). Die proteolytische Spaltung geschah während der Dialyse durch Zugabe der Protease in den Dialyseschlauch. Insgesamt wurden Fusionsprotein und Protease etwa 24 h bei 4 °C inkubiert. Vor und nach der Spaltung entnommene Proben wurden gelelektrophoretisch analysiert (Abb. 4.4). Dabei zeigte sich, dass die enzymatische Spaltung durch PreScission-Protease nicht vollständig erfolgt. Nach 24 h Spaltung kann immer noch Trx-Prouroguanylin als schmale Bande auf dem Gel beobachtet werden. Auch durch längere Inkubationszeiten und Zugabe von mehr PreScission-Protease konnte keine vollständige Spaltung erreicht werden. Die beiden Spaltprodukte lassen sich im Gel einfach anhand ihrer Massen identifizieren. Der Thioredoxin-Hexahistidin-Anhang (Trx) hat eine rechnerische

Masse von 17,6 kDa und läuft somit auf dem Gel deutlich oberhalb des freien Prouroguanylin, welches eine theoretische Masse von 9,6 kDa besitzt.

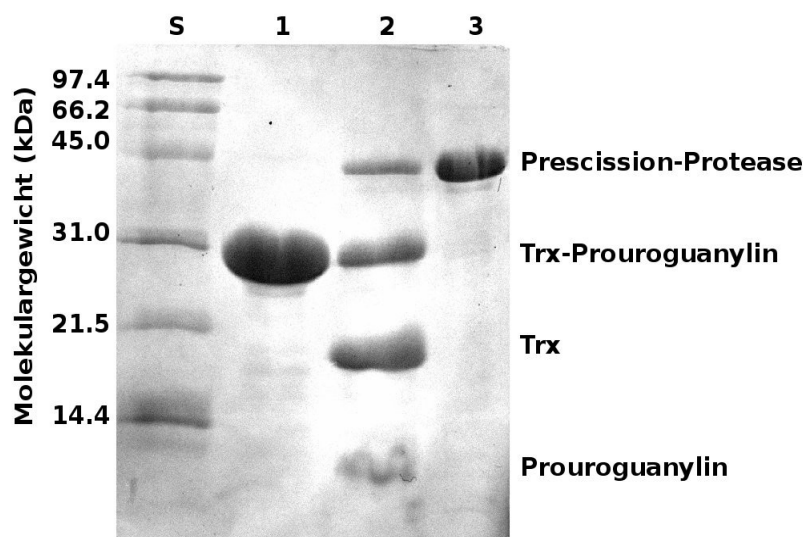


Abb. 4.4: PreScission-Spaltung von Trx-Prouroguanylin. Proben wurden auf ein 19 %iges SDS-Gel aufgetragen. S: low range Proteinstandard; 1: vor Spaltung; 2: nach Spaltung; 3: PreScission-Protease.

Um reines Prouroguanylin zu erhalten mussten aus dem Spaltansatz sowohl die zugesetzte PreScission-Protease als auch das ungespaltene Fusionsprotein und der freie Fusionsanhang entfernt werden. PreScission-Protease besitzt einen GST-Anhang und kann somit leicht durch eine GSTrap<sup>TM</sup>-Säule abgetrennt werden. Trx-Prouroguanylin und Trx können durch ihre Hexahistidinanhänge mit Hilfe von Nickelionen-Affinitätschromatographie aus dem Gemisch entfernt werden. Ein mit Nickel beladenes Säulenmaterial wurde in diesem Fall gewählt, da Nickel eine größere Bindungsaffinität und -kapazität als Cobalt hat.

Einzig Prouroguanylin bindet weder an die GSTrap<sup>TM</sup>-Säule noch an die Nickelsäule und befindet sich beide Male im Säulendurchfluss (Abb. 4.5). Das SDS-Gel bestätigt, dass freies Prouroguanylin im Säulendurchfluss der Nickelionen-Chromatographie gefunden werden kann (Abb. 4.5 B Bahn 2). Prouroguanylin konnte in guter Reinheit erhalten werden, es sind nur mit Mühe schwache Banden von Trx bzw. Trx-Prouroguanylin zu erkennen. Prouroguanylin wurde gegen H<sub>2</sub>O bidest. dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die Ausbeute pro Liter Bakterienkultur betrug 3,5 mg reines Prouroguanylin.

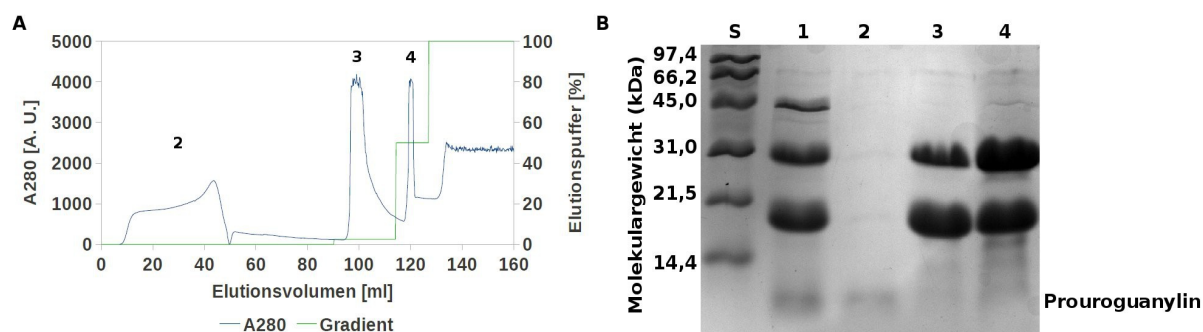


Abb. 4.5: Nickelionen-Affinitätschromatographie zur Reinigung von Prouroguanylin von Trx und Trx-Prouroguanylin. Der Elutionspuffer enthielt 1 M Imidazol. A) Chromatogramm. B) 19 %iges SDS-Gel. S: Molekulargewichtsstandard; 1: Probe vor GST<sup>TM</sup>-Trap und Nickelsäule; 2: Säulendurchfluss Nickelsäule; 3: Elutionspeak bei 25 mM Imidazol; 4: Elutionspeak bei 500 mM Imidazol.

#### 4.1.4 NMR-Spektroskopie mit <sup>15</sup>N-markiertem Prouroguanylin

Die Markierung von Prouroguanylin mit dem NMR-aktiven Stickstoffisotop <sup>15</sup>N erlaubt die Charakterisierung des rekombinanten Proteins mittels heteronuklearer NMR-Experimente. Dazu wurden die Zellen *E. coli* Origami B (DE3)/pET32a-Asp-pres-prouroguanylin in mit <sup>15</sup>N angereichertem M9-Minimalmedium angezogen (siehe Kap. 3.4.1). Im Unterschied zur Anzucht in LB-Medium wurden die Zellen nach der Induktion jedoch bei 20 °C über Nacht inkubiert, um dem in Minimalmedium langsameren Zellwachstum Rechnung zu tragen. Die Reinigung des <sup>15</sup>N-markierten Prouroguanylins vollzog sich dann analog zum nicht markierten Protein.

Die Isotopenmarkierung von Proteinen ist Voraussetzung für deren Charakterisierung durch heteronukleare NMR-Experimente. Diese erlauben die Auftrennung der Signale des NMR-Spektrums entlang zusätzlicher, durch die NMR-aktiven Heterokerne bestimmten Dimensionen und verringern damit die Überlagerung von Signalen, die vor allem bei größeren untersuchten Molekülen oft problematisch ist. Daneben ermöglichen NMR-aktive Heteronuklei einen verbesserten Kohärenztransfer im Molekül, was sich in einer größeren Sensitivität mehrdimensionaler NMR-Experimente niederschlägt.

Von <sup>15</sup>N-markiertem Prouroguanylin wurde eine [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-HSQC-Spektrum aufgenommen (Abb. 4.6). Die Amidsignale im Spektrum zeigen eine starke Dispersion in der Protonendimension, was darauf hindeutet, dass das Protein eine ausgeprägte Tertiärstruktur besitzt. Ein weiteres auffälliges Merkmal des Spektrums ist die Anzahl der detektierten Signale. Für rekombinantes



Prouroguanylin, einem Protein mit 88 Aminosäuren und 7 Prolinen, wären 80 Resonanzsignale des Peptidrückgrates zu erwarten. Im vorliegenden Spektrum kann man jedoch 155 Rückgratsignale unterscheiden. Außerdem fällt auf, dass einige Signale paarweise dicht beieinander liegen. Dies weist auf das Vorliegen des Proteins in zwei, oder mehreren, Konformationen hin, die miteinander im Austausch stehen.

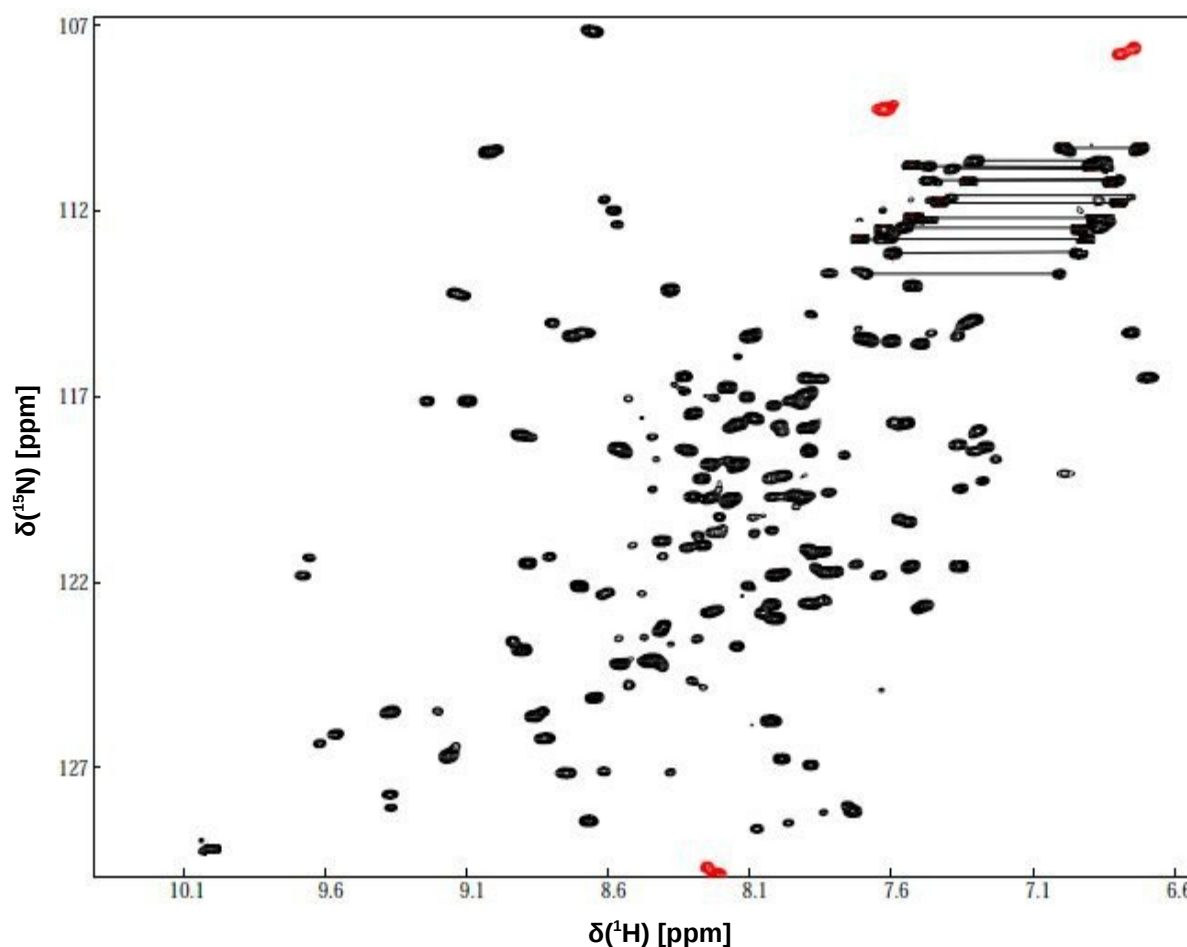


Abb. 4.6: [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -angereichertem rekombinantem Prouroguanylin. Signale der Seitenketten Glutamin und Asparagin sind mit Linien markiert. Negative Signale, die durch spektrale Faltung entstehen, sind rot dargestellt. Das Spektrum wurde aufgenommen bei 25 °C, in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,8, 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  und 0,04 %  $\text{NaN}_3$ . Die Probenkonzentration betrug 400  $\mu\text{M}$ .

#### 4.1.5 Freisetzung von Uroguanylin

Um zu zeigen, dass aus dem rekombinanten Prouroguanylin auch biologisch aktives Uroguanylin

freigesetzt werden kann, wurde es mit Trypsin gespalten (siehe Kap. 3.20). Zwar ist nicht geklärt, welche Proteasen *in vivo* für die Prozessierung des Prohormons zum Hormon verantwortlich sind, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass im Fall von Proguanylin Trypsin an dem Prozess beteiligt ist (de Sauvage *et al.*, 1992). Trypsin spaltet auf der C-terminalen Seite der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, und setzt aus Prouroguanylin das Fragment TIANDDCELCNVNACTGCL frei. Das lyophilisierte Prouroguanylin wurde gelöst und über Nacht bei 37 °C mit 30 µg Trypsin pro 10 mg Prouroguanylin verdaut. Aus dem Spaltansatz wurde Uroguanylin durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt (Abb. 4.7).

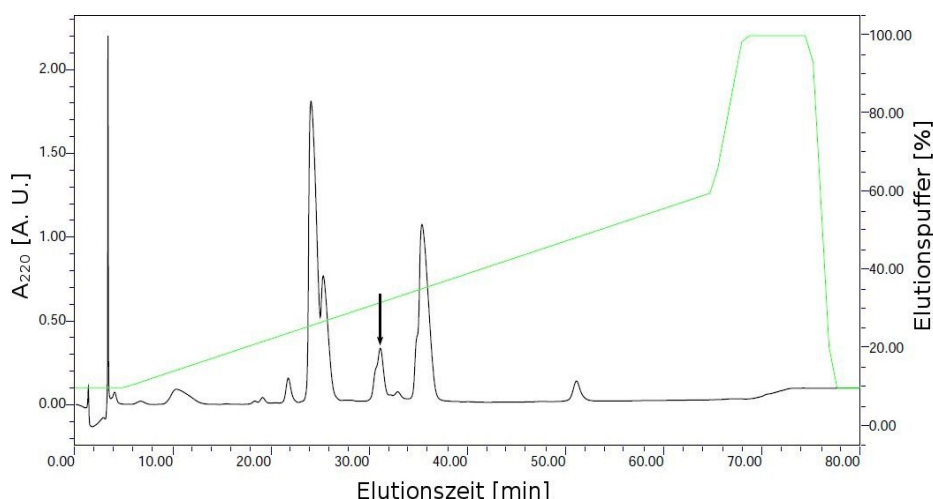


Abb. 4.7: Reinigung von Uroguanylin aus dem Trypsin-Spaltansatz durch RP-HPLC. Der Pfeil markiert den Elutionspeak, der das Hormon enthält. Der Gradient ist grün dargestellt. Als Elutionspuffer wurde 80 % Acetonitril, 0,1 % TFA verwendet. Menge an gespaltenem und auf die Säule aufgetragenem Prouroguanylin: 11 mg.

Die chromatographische Trennung des Trypsin-Spaltansatzes führt zu einer Reihe von Elutionsgipfeln, die insgesamt gut voneinander separiert sind. Die eluierte Fraktion, die das Uroguanylin-Peptid enthält, wurde durch Massenspektrometrie identifiziert. Demnach eluiert Uroguanylin bei einem Acetonitril-Anteil von 24 % von der Säule. Der Elutionsgipfel selbst ist nicht vollständig isoliert sondern überlappt teilweise mit einem weiteren Peptid, das unmittelbar vor Uroguanylin eluiert. NMR-spektroskopische Analysen haben gezeigt, dass es sich bei diesem Elutionsgipfel um fehlgefaltetes und damit inaktives Uroguanylin handelt. Beim Sammeln der Uroguanylin-Fraktion wurde darauf geachtet, möglichst wenig von dieser inaktiven Verunreinigung mit in die Probe einzuschleppen. Dabei musste in Kauf genommen werden, einen Teil des

gereinigten Uroguanylins zu verlieren. Die Fraktion wurde vakuumgetrocknet, um das Acetonitril aus der Probe zu entfernen. Für die weitere Analyse wurde das Peptid in H<sub>2</sub>O resuspendiert und der pH auf ca. 3 eingestellt. Das MALDI-TOF-Massenspektrum der Probe zeigt die erwartete Masse von 1975,4 Da und 2013,4 Da (Abb. 4.8 A). Das <sup>15</sup>N-markierte Peptid TIANDDCELCVNVACTGCL hat ein theoretisches Molekulargewicht von 1974,2 Da, so dass es sich bei den beiden Massen um die Ionen [M+H]<sup>+</sup> und [M+K]<sup>+</sup> handelt.

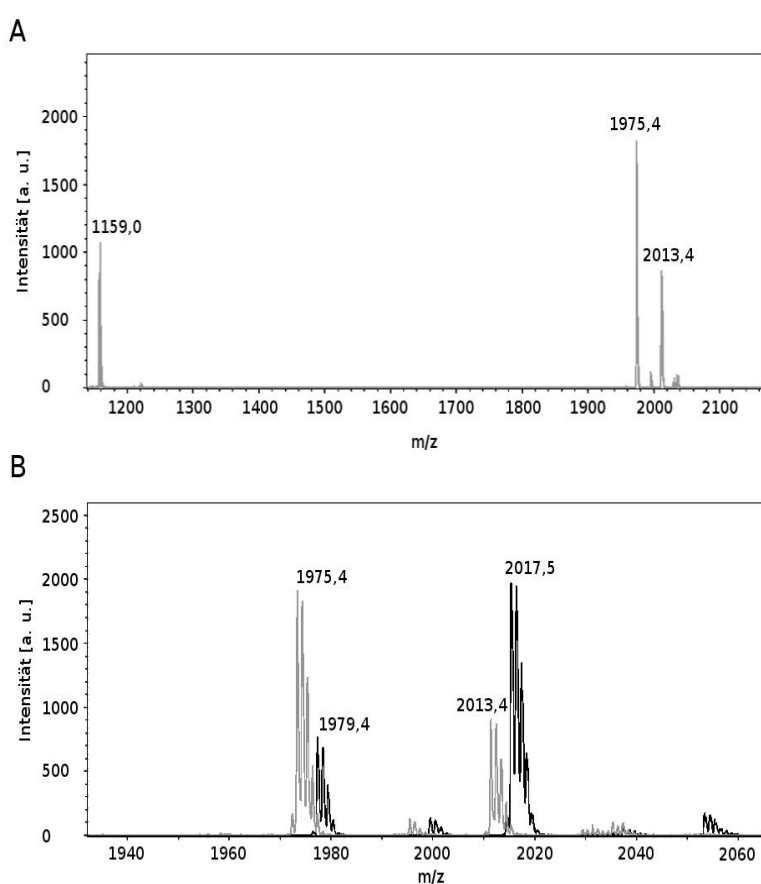


Abb. 4.8: MALDI-TOF Massenspektrum von <sup>15</sup>N-markiertem Uroguanylin. A) Massenspektrum von rekombinant hergestelltem <sup>15</sup>N-markiertem Uroguanylin. Theoretische Massen: 1975,2 [M+H]<sup>+</sup>, 2013,2 [M+K]<sup>+</sup>. B) Massenspektrum von oxidiertem (grau) und reduziertem (schwarz) <sup>15</sup>N-Uroguanylin. Die deutlich sichtbare Isotopenverteilung im Spektrum ist ein Resultat der nicht zu 100 % erfolgten <sup>15</sup>N-Markierung. Durch die Reduktion erhöht sich die Masse um 4 Da, im Einklang mit dem Vorliegen von zwei Disulfidbrücken in oxidiertem Uroguanylin.

Daneben ist ein weiterer Massenpeak bei 1159,0 Da zu beobachten, dessen Identität nicht geklärt werden konnte. Mit Massenspektrometrie wurde auch überprüft, ob das Peptid vollständig disulfidverbrückt ist. Dazu wurde die Probe mit DTT reduziert und die Massenspektren von reduzierter und ursprünglicher Probe miteinander verglichen (Abb. 4.8 B). Die beiden Peaks für [M+H]<sup>+</sup> und

$[M+K]^+$  im Massenspektrum der reduzierten Probe sind relativ zur oxidierten Probe um 4 Da zu größeren Massen hin verschoben. Auf diese Weise kann gezeigt werden, dass das gereinigte Peptid tatsächlich zwei Disulfidbrückenbindungen enthält. Der Nachweis dafür, dass es sich dabei um die beiden richtigen, auch in natürlichem Uroguanylin vorliegenden Disulfidbrücken handelt, erfolgte über die Bestimmung der biologischen Aktivität des Peptids (siehe Kap. 4.2.7).

#### 4.1.6 NMR-spektroskopische Charakterisierung von rekombinantem Uroguanylin

Die Lösungsstrukturen der beiden Topoisomere von Uroguanylin wurden von Marx *et al.* bestimmt (Marx *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass die beiden Topoisomere anhand der chemischen Verschiebungen ihrer Protonen unterscheidbar sind. Um nachzuweisen, dass es sich bei dem gereinigten Peptid tatsächlich um Uroguanylin in der biologisch aktiven A-Konformation handelt, wurden NMR-Experimente zur Zuordnung der Protonenresonanzen durchgeführt (Abb. 4.9).

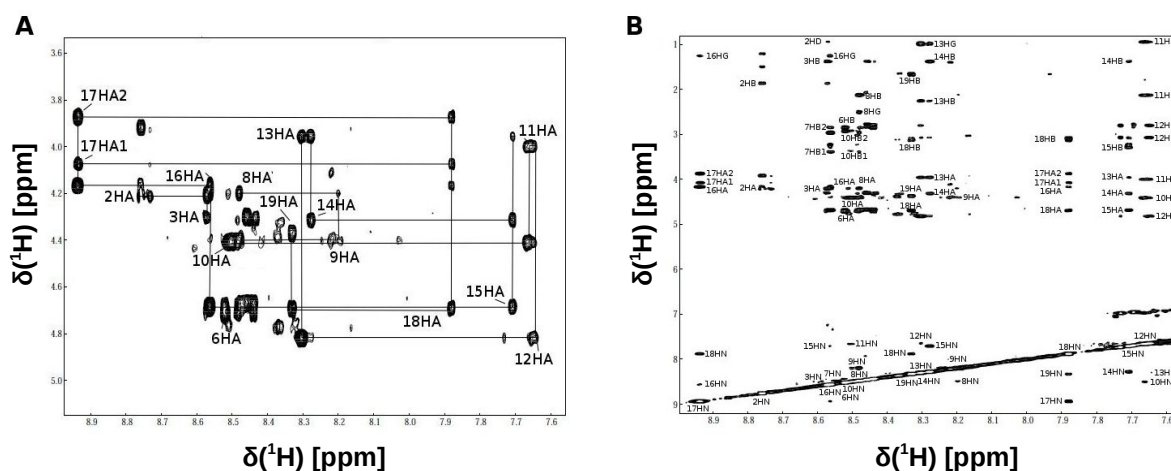


Abb. 4.9: Ausschnitte aus einem NOESY-Spektrum von 160  $\mu$ M unmarkiertem rekombinantem Uroguanylin. A) Ausschnitt der sog. Fingerprints-Region, in der die Kreuzsignale zwischen Amid- und  $\alpha$ -Protonen liegen. Beschriftet sind nur intraresiduale Kreuzsignale. Linien deuten die sequentiellen Konnektivitäten der Signale an. B) Ausschnitt aus dem Amidbereich des NOESY-Spektrums. Alle zugeordneten Kreuzsignale der Amidprotonen sind beschriftet mit der zugehörigen Sequenzposition und der Position innerhalb der jeweiligen Aminosäure. Messbedingungen:  $H_2O$ , pH 3,3 (10 %  $D_2O$ , v/v), 11 °C, Mischzeit: 300 ms.

Die rekombinante Expression und Reinigung von Uroguanylin erlaubt die kostengünstige

Herstellung von unmaklierten und  $^{15}\text{N}$ -markierten Peptidproben. Zur Zuordnung der Protonenresonanzen wurden TOCSY- und NOESY-Spektren von unmarkiertem Uroguanylin aufgenommen. In den zweidimensionalen Spektren kommt es nur in geringem Ausmaß zu Signalüberlappungen, so dass die Zuordnung unter Verwendung von homonuklearen Standardmethoden (Wüthrich, 1986) erfolgen konnte. Dabei dienten sequentielle NOE-Signale, v. a. im Bereich der  $\alpha$ - und Amidprotonen, dazu, die Konnektivitäten entlang der Peptidkette aufzuklären (Abb. 4.9 A).

Insgesamt konnten die Protonen der 14 C-terminalen Aminosäuren, von Asp-6 bis Leu-19, zugeordnet werden (Abb. 4.9 B). Ile-2 und Ala-3 konnten aufgrund ihrer charakteristischen chemischen Verschiebungen im Spektrum identifiziert werden. Die Aminosäuren Asn-4 und Asp-5 konnten dagegen aufgrund von sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen und dem Fehlen von sequentiellen NOE-Signalen nicht eindeutig zugeordnet werden.

Die so zugeordneten Resonanzsignale können mit chemischen Verschiebungen von chemisch synthetisiertem Uroguanylin aus der Literatur verglichen werden (Marx *et al.*, 1998) und weisen die vorliegende Probe als die biologisch aktive A-Form aus (siehe Kap. 10.1.12). Diskrepanzen zu den Literaturwerten weisen nur die Amidresonanzen von Asp-6 und Leu-19 auf. Für Asp-6 kann dies durch die Gegenwart der zusätzlichen drei N-terminalen Aminosäuren Thr-1, Ile-2 und Ala-3 erklärt werden, die beim chemisch synthetisierten Uroguanylin fehlen. Die chemische Verschiebung des Amidsignals des C-terminalen Leu-19 wird besonders stark durch pH-Variationen beeinflusst, so dass kleine Abweichungen vom Literaturwert auf nicht völlig identische pH-Bedingungen zurückzuführen sind.

Mit der  $^{15}\text{N}$ -markierten Uroguanylin-Probe wurde ein  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum aufgenommen (Abb. 4.10). Die Zuordnung der Resonanzen wurde aus dem NOESY-Spektrum übertragen und durch Messung eines  $^{15}\text{N}$ -editierten NOESY-Experiments verifiziert.

Die topoisomere Umwandlung von Uroguanylin zwischen A-Form und B-Form vollzieht sich bei saurem pH temperaturabhängig innerhalb weniger Tage, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen beiden Isomeren einstellt. Das Verhältnis von A- und B-Form im Gleichgewicht liegt bei etwa 1:1 mit einer geringfügigen thermodynamischen Präferenz für die A-Form (Marx *et al.*, 1998). Im Einklang damit war die  $^{15}\text{N}$ -markierte NMR-Probe über zwei Wochen lang völlig stabil, falls sie bei 4 °C aufbewahrt wurde. Die Inkubation der NMR-Probe bei Raumtemperatur führte jedoch schon nach 2 Tagen dazu, dass im  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum eine Reihe neuer Signale detektiert wurden (Abb. 4.10 B). Die Amidprotonen-Resonanzen dieser Signale stimmen mit den Literaturwerten der B-Form von Uroguanylin überein (Marx *et al.*, 1998).

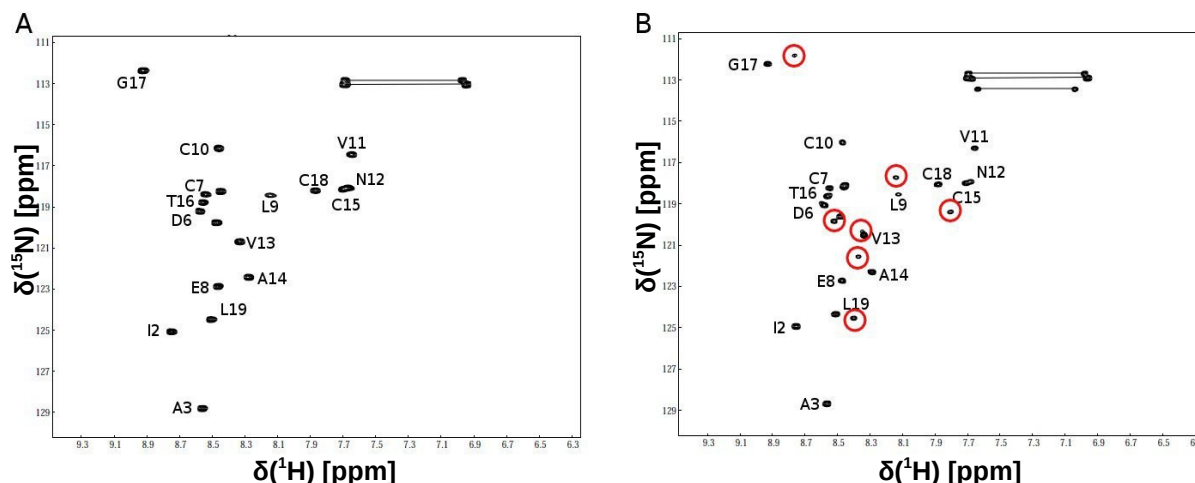


Abb. 4.10: [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC von  $140\ \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -markiertem rekombinanten Uroguanylin A) direkt nach dem Lösen des getrockneten Peptids und B) nach 4 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur. Signale, die nach der Inkubation neu auftauchen, sind durch rote Kreise gekennzeichnet. Die Messung wurde in  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 3,3 (10 %  $\text{D}_2\text{O}$ , v/v) bei  $11\ ^\circ\text{C}$  durchgeführt. Seitenketten-Amidsignale sind durch Linien gekennzeichnet. Die Resonanzsignale sind mit dem Ein-Buchstaben-Code der entsprechenden Aminosäure und der Sequenzposition beschriftet.

## 4.2 Rekombinante Herstellung von *E. coli* STh durch Prosequenz-Austausch

Die bakteriellen hitzestabilen Enterotoxine STh und STp sind wesentlich stärkere Agonisten der Guanylatzyklase C als Uroguanylin. Aufgrund von drei Disulfidbrücken sind sie auch strukturell komplexer als die endogenen Hormone. Diese disulfidreiche Struktur verleiht den Toxinen nicht nur ihre thermische Stabilität sondern schützt sie auch vor dem Abbau durch Proteasen (Nair & Takeda, 1998). Die chemische Synthese von STh ist möglich, jedoch sehr aufwendig, da sie den Einsatz orthogonaler Schutzgruppen zur selektiven Einführung der Cystine erfordert. Die Entwicklung einer Strategie zur rekombinanten Expression und Reinigung von STh bietet hier nicht nur ökonomische Vorteile. Auch die einfache Herstellung isotopenmarkierter Sth-Peptide kann durch Expression in *E. coli* ermöglicht werden. Diese wiederum können für NMR-Bindungsstudien mit STh und GC-C eingesetzt werden.

### 4.2.1 Das Konstrukt pET32a-Asp-pres-Prouro-STh

Für eine erfolgreiche Herstellung von STh in Bakterien muss gewährleistet sein, dass sich die drei Disulfidbrücken des Enterotoxins selektiv ausbilden. Bei einer einfachen Oxidation des Peptids wäre eine Mischung verschieden disulfidverbrückter Spezies zu erwarten. Bei 6 Cysteinen sind für das STh-Peptid 15 verschiedene Verbrückungsmuster denkbar (Shimonishi *et al.*, 1987; Gariepy *et al.*, 1987). Zwar sind nicht alle möglichen Isomere thermodynamisch günstig, jedoch würde die Gesamtausbeute an biologisch aktivem STh bei zufälliger Oxidation der Cysteine deutlich eingeschränkt und es wäre eine potentiell schwierige Trennung des korrekt disulfidverbrückten STh von inaktiven Spezies erforderlich.

Eine elegante Lösung des Problems der selektiven Einführung von Disulfidbrücken ist die Verwendung der Prosequenz von Uroguanylin zur Unterstützung der korrekten Faltung und Oxidation von STh. Uroguanylin und STh ähneln einander nicht nur in ihrer Aminosäuresequenz, auch die Rückgratkonformationen beider Peptide sind vergleichbar (Marx *et al.*, 1998), so dass das Prinzip der Prosequenz-vermittelten Uroguanylin-Faltung auf STh übertragbar erscheint. Um dies zu überprüfen, wurde das Konstrukt pET32a-Asp-pres-Prouro-STh entworfen (siehe Anhang, Kap. 10.1.2). Es ist von pET32a-Asp-pres-Prouroguanylin abgeleitet (siehe Kap. 4.1.1) und kodiert für ein Fusionsprotein das sich nur in den C-terminalen 19 Aminosäuren von Trx-Prouroguanylin unterscheidet. Hier wurde die Sequenz von rekombinantem Uroguanylin durch die 19 Aminosäuren umfassende STh-Sequenz ersetzt (Abb. 4.11). In der Sequenz liegen Disulfidbrücken Cys7-Cys15 und Cys10-Cys18 von STh an der gleichen Position, an der die beiden Disulfidbrücken in der Hormonregion von Prouroguanylin liegen. Es wurde erwartet, dass die Proregion die Ausbildung dieser Cystine genauso unterstützen kann, wie dies bei Uroguanylin geschieht. Auf diese Weise wird eine zufällige Oxidation der Cysteine verhindert und die dritte Disulfidbrücke von STh, Cys6-Cys11, sollte sich anschließend spontan ausbilden.

Es wurde ein synthetisches Gen mit 95 bp erstellt, das die Aminosäuresequenz von STh kodiert und anschließend unter Verwendung der Enzyme *HindIII* und *XhoI* an die Stelle von Uroguanylin in das Plasmid pET32a-Asp-pres-prouroguanylin subkloniert wurde. Die Synthese des Gens und die Klonierung wurden von der Firma Eurofins Medigenomix (Ebersberg, Deutschland) übernommen. Das Konstrukt wurde in *E. coli* Origami B (DE3) exprimiert, die durch ihr oxidatives Cytoplasma die intrazelluläre Ausbildung der Cystine erlauben. Analog zu pET32a-Asp-pres-Prouroguanylin enthält auch pET32a-Asp-pres-Prouro-STh einen Thioredoxin- und Hexahistidin-Anhang, die beide durch eine PreScission-Schnittstelle abspaltbar sind.

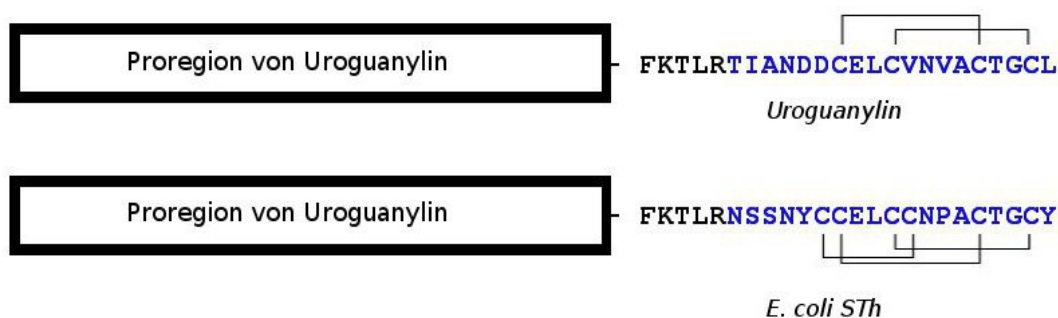


Abb. 4.11: Schematischer Vergleich der Proteine Prouroguanylin (oben) und ProuroSth (unten). Die Hormon- bzw. Toxinregion ist blau markiert. Disulfidbrücken sind durch Linien angedeutet.

#### 4.2.2 Expression von pET32a-Asp-pres-Prouro-STh in *E. coli* Origami B (DE3)

Das Plasmid pET32a-Asp-pres-Prouro-STh wurde durch Elektroporation in *E. coli* Origami B (DE3) eingeführt. Die Selektion auf positive Klone erfolgte durch Ausplattieren der Transformanten auf LB-Agar mit Ampicillin, Tetracyclin und Kanamycin (siehe Kap. 3.17). Tetracyclin und Kanamycin dienen dabei der Selektion von Klonen mit oxidativem Cytoplasma. Die auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,2 angimpften LB-Hauptkulturen erreichten innerhalb von ca. 2 Stunden eine OD<sub>600</sub> von 0,8 und wurden mit 1 mM IPTG induziert. Da sich gezeigt hat, dass das exprimierte Trx-Prouro-STh deutlich schlechter löslich ist als Trx-Prouroguanylin, wurde die Expressionstemperatur auf 25 °C herabgesetzt, womit eine geringere Expressionsrate des rekombinanten Proteins erreicht werden soll. Da die Menge an Fremdprotein im Cytosol der Bakterien bei 25 °C langsamer ansteigt, kommt es in geringerem Ausmaß zur Bildung von nur schwer löslichen Einschlusskörpern. Um dennoch hohe Zelldichten und damit eine hohe Ausbeute an rekombinanten Protein zu erreichen, wurde die Expression über Nacht durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Ernte der Zellkultur lag deren OD<sub>600</sub> bei 3,2 – 4. Die Expression von Trx-Prouro-STh wurde durch SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.12). Auf dem SDS-Gel ist deutlich die induzierte Expression in Form einer Bande bei etwa 29 kDa zu erkennen. Dabei handelt es sich um das rekombinante Trx-Prouro-STh, dessen theoretisches Molekulargewicht bei 27,4 kDa liegt. Die hohe Intensität der Bande relativ zum Hintergrund der Wirtsproteine zeigt, dass, bei den gewählten Bedingungen, das heterologe Protein in hohen Mengen exprimiert wird.



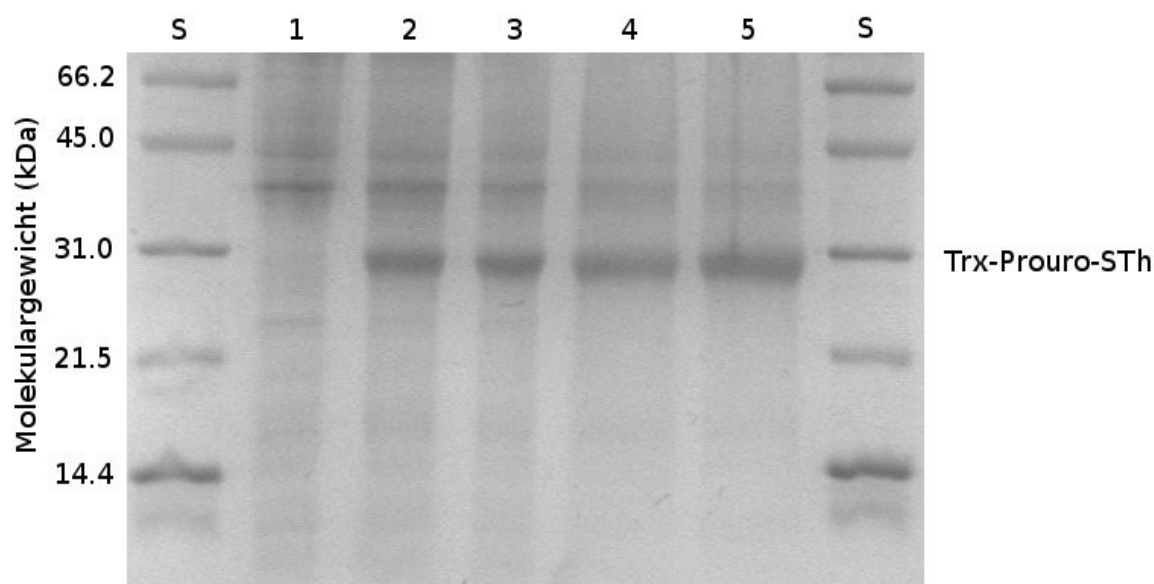


Abb. 4.12: Expression von Trx-Prouro-STh in *E. coli* Origami B (DE3). Die Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert. Zellproben wurden auf ein 19 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. S: low range Proteinstandard; 1: Zellpellet vor Induktion; 2 – 5: Zellpellets 1 h, 2 h, 3 h und 20 h nach Induktion.

## 4.2.3 Reinigung von Prouro-STh

### 4.2.3.1 Zellaufschluss und Reinigung von Trx-Prouro-STh

Die Lyse der Bakterien erfolgte durch den Microfluidizer. Während der Lyse wurde die Bildung eines flockigen Niederschlags unlöslichen Proteins beobachtet, ähnlich wie bei der Reinigung von Prouroguanylin jedoch in geringerem Umfang. Wie erwartet ist nahezu kein Trx-Prouro-STh in der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses zu finden (Abb. 4.13, Bahn 1). Das Protein bildet unlösliche Aggregate und muss durch Harnstoff in Lösung gebracht werden.

Es zeigt sich auch, dass Trx-Prouro-STh wesentlich schwerer löslich ist als Trx-Prouroguanylin, das mit 4 M Harnstoff nahezu vollständig solubilisiert werden kann. Nach Extraktion mit 8 M Harnstoff konnte zwar ein großer Teil des Fusionsproteins in Lösung gebracht werden, jedoch war noch immer ein deutlicher Anteil im unlöslichen Pellet detektierbar (Abb. 4.13).

Die unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation vom solubilisierten Fusionsprotein getrennt. Um das Protein nach der Harnstoffextraktion wieder zurückzufalten wurde die Harnstoffkonzentration durch Verdünnung auf 2 M gesenkt, wobei ein kleiner Teil des Fusionsproteins ausfiel. Jedoch konnte dieser Anteil minimiert werden, indem die Verdünnung stufenweise, zuerst

auf 4 M Harnstoff und nach wenigen Stunden Inkubation auf 2 M Harnstoff, durchgeführt wurde.

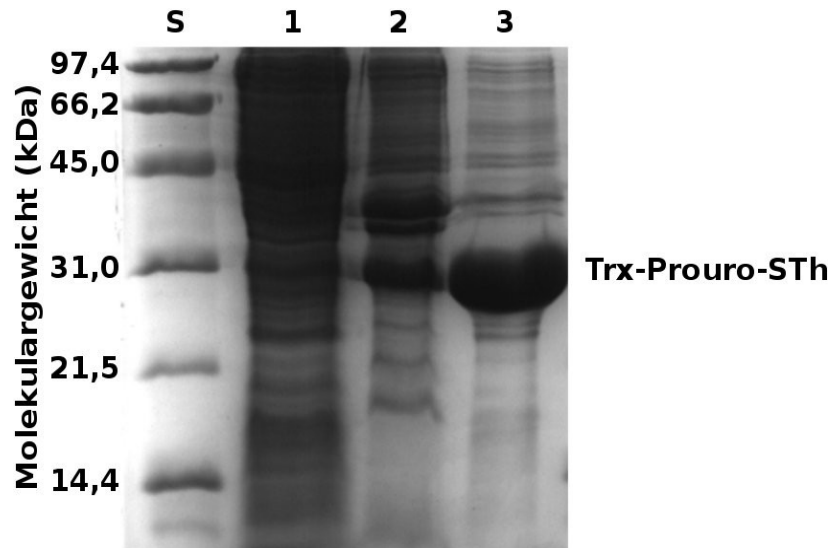


Abb. 4.13: Zellaufschlusse von *E. coli* Origami B (DE3) pET32a-Asp-pres-Prouro-STh und Harnstoffextraktion von Trx-Prouro-STh. Proben wurden auf ein 19 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. S: low range Proteinstandard; 1: lösliche Fraktion der Lyse; 2: Pellet nach Harnstoffextraktion; 3: Überstand nach Harnstoffextraktion.

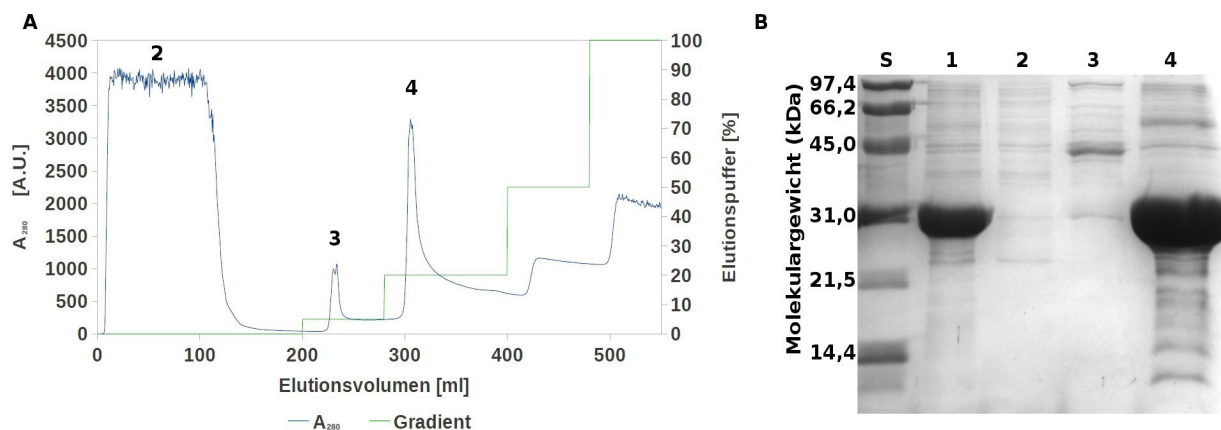


Abb. 4.14: Cobaltionen-Affinitätschromatographie zur Reinigung von Trx-Prouro-STh. A) Chromatogramm; B) 19 % SDS-Polyacrylamidgel. S: low range Proteinstandard; 1: aufgetragener Harnstoffextrakt; 2: Säulendurchfluss; 3: Elutionsfraktion bei 25 mM Imidazol; 4: Elutionsfraktion bei 200 mM Imidazol.

Aus dem verdünnten Harnstoffextrakt wurde das Fusionsprotein durch Cobaltionen-Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 4.14). Es eluiert von der Säule bei einer Imidazolkonzentration von 200 mM. Die gelelektrophoretische Analyse der eluierten Fraktion (Abb. 4.14 B) lässt zwar erkennen, dass sie in geringem Umfang Verunreinigungen enthält, jedoch kann angesichts der Intensität der Bande von Trx-Prouro-STh von einer Reinheit von weit über 95 % ausgegangen werden.

#### 4.2.3.2 Spaltung von Trx-Prouro-STh mit PreScission-Protease

Zur Abspaltung des Prouro-STh von seinen Fusionspartnern wurde das Fusionsprotein mit PreScission-Protease behandelt. Die enzymatische Spaltung wurde während der Dialyse des Fusionsproteins durch Zugabe der Protease in den Dialyseschlauch durchgeführt. Die Spaltung des Fusionsproteins wurde gelelektrophoretisch kontrolliert (Abb. 4.15). Prouro-STh erscheint nach der Spaltung als dünne Bande bei etwa 10 kDa, was in gutem Einklang mit dem theoretischen Molekulargewicht von 9,7 kDa steht.

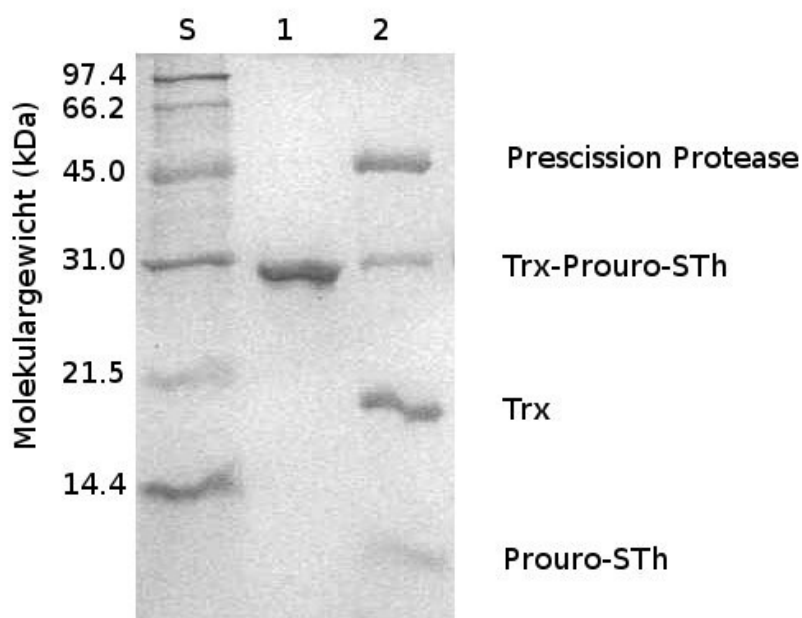


Abb. 4.15: Enzymatische Spaltung des Fusionsproteins Trx-Prouro-STh durch PreScission Protease zur Freisetzung von Prouro-STh. 19 % SDS-Polyacrylamidgel. S: low range Proteinstandard; 1: Probe vor der PreScission-Zugabe; 2: Probe 36 h nach Zugabe von PreScission (Weiglmeier et al., 2013).

Die Identität der Bande wurde durch Peptidmassenfingering bestätigt. Selbst nach einer Inkubationszeit von 36 h war die Spaltung des Fusionsproteins nicht vollständig. Ein kleiner Teil des Fusionsproteins blieb im Spaltansatz erkennbar. Dies liegt möglicherweise daran, dass die Pufferbedingungen für die Spaltung durch PreScission Protease nicht optimal waren. Der in der

Literatur vorgeschlagene PreScission-Puffer enthält 1 mM DTT, das die Aktivität der Cystein-Protease PreScission über einen längeren Zeitraum stabilisiert. Allerdings kann aufgrund der in ProuroSTh enthaltenen Disulfidbrücken kein Reduktionsmittel wie DTT zum Spaltpuffer zugegeben werden. Selbst durch die nochmalige Zugabe eines Aliquots der Protease zum Spaltansatz ließ sich keine vollständige Spaltung erreichen.

Trotz der nicht ganz vollständigen Spaltung wurde Prouro-STh aus dem Spaltansatz isoliert. Analog zur Reinigung von Prouroguanylin wurde die PreScission-Protease durch GST-Affinitätschromatographie aus der Lösung abgetrennt, während Trx und das ungespaltene Fusionsprotein Trx-Prouro-STh durch Nickelionen-Affinitätschromatographie entfernt wurden (siehe Kap. 3.19.2). Der Durchfluss, der nur noch Prouro-STh enthielt, wurde gegen 1 mM TrisHCl, pH 8.0 dialysiert und anschließend lyophilisiert.

#### 4.2.4 [ $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum von $^{15}\text{N}$ -markiertem Prouro-STh

Die Expression von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Prouro-STh erfolgte durch Kultivierung der Bakterien in M9-Minimalmedium, dem [ $^{15}\text{N}$ ]- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als einzig verfügbare Stickstoffquelle zugesetzt wurde. Ansonsten unterschied sich die Proteinexpression und -reinigung nicht vom für unmarkiertes Prouro-STh beschriebenen Vorgehen. Das lyophilisierte Prouro-STh wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.8 gelöst. Dabei hat sich gezeigt, dass die Löslichkeit von Prouro-STh im Vergleich zu Prouroguanylin deutlich geringer ist. Es konnten lediglich etwa 50  $\mu\text{M}$  Prouro-STh in Lösung gebracht werden. Bei höheren Konzentrationen kommt es bei Raumtemperatur innerhalb weniger Minuten zur Niederschlagsbildung. Dennoch reicht die Konzentration der Probe aus, um ein [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum aufzunehmen (Abb. 4.16). Dieses zeigt anhand der guten Dispersion entlang der Protonendimension (6,6 ppm – 9,3 ppm), dass eine deutlich ausgeprägte Tertiärstruktur des Proteins vorliegt, es also gefaltet ist. Das Auftreten von paarweise nahe beieinander liegenden Signalen, wie im HSQC-Spektrum von Prouroguanylin (Abb. 4.6), ist nicht zu beobachten.

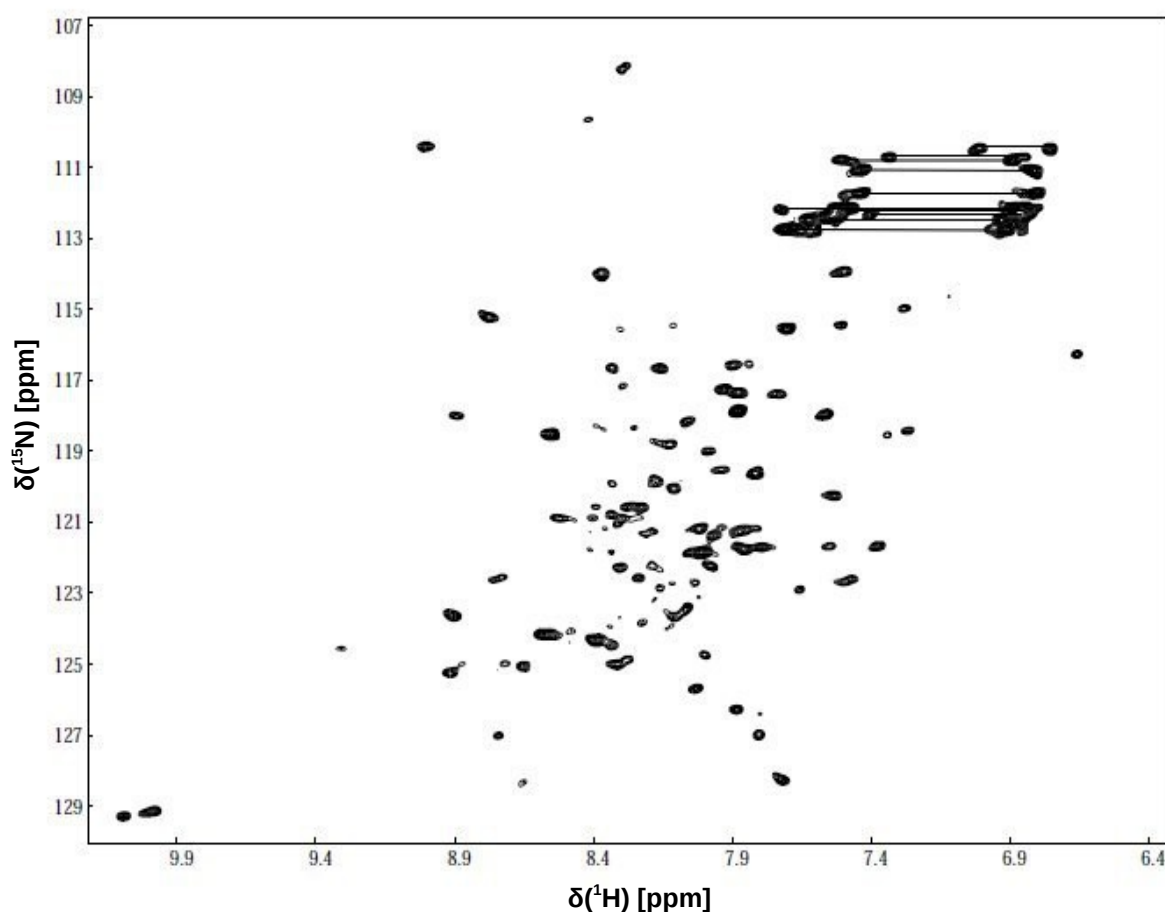


Abb. 4.16:  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Prouro-STh. Signale der Seitenketten von Asparagin und Glutamin sind durch Linien gekennzeichnet. Das Spektrum wurde bei 25 °C aufgenommen. Der verwendete Messpuffer enthielt 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,8, 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  (v/v) und 0,04 %  $\text{NaN}_3$  (w/v). Die Probenkonzentration betrug 45  $\mu\text{M}$ .

#### 4.2.5 Trypsin-Verdau von Prouro-STh

Aus dem gereinigten Prouro-STh wurde das Enterotoxin STh proteolytisch durch Trypsin freigesetzt. Trypsin spaltet nach Argininen und setzt aus Prouro-STh, neben anderen Fragmenten, das C-terminale Peptid NSSNYCCELCCNPACTGCY frei, das genau der Sequenz von nativem STh entspricht. Die Spaltung erfolgte bei 37 °C für eine Dauer von 18 Stunden und wurde dann durch Senken des pH von 7,8 auf 3,0, wodurch Trypsin inaktiviert wird, unterbrochen (siehe Kap. 3.20.1). Aus dem Spaltansatz wurde STh durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt (Abb. 4.17).

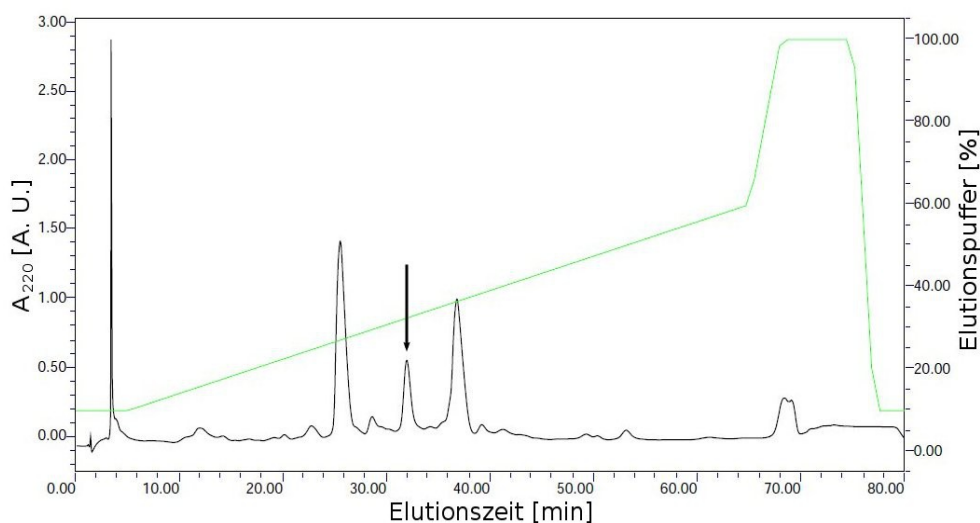


Abb. 4.17: Isolierung von STh durch RP-HPLC. Der Elutionsgipfel, der STh enthält, ist durch einen Pfeil markiert. Der verwendete Elutionspuffer enthielt 80 % Acetonitril (v/v) und 0,1 % TFA. Der Gradient ist grün dargestellt. Menge an gespaltenem Prouro-STh: 10 mg.

Dabei ergibt sich ein Chromatogramm das erwartungsgemäß große Ähnlichkeiten mit dem von gespaltenem Prouroguanylin aufweist (Abb. 4.7). Bei etwa 26 % Acetonitril tritt ein deutlicher Elutionsgipfel auf, der massenspektrometrisch als STh identifiziert wurde. Die Lage dieses STh-Elutionsgipfels ist vergleichbar mit dem Elutionsverhalten von Uroguanylin. Dies ist nicht verwunderlich angesichts der gleichen Länge und des ähnlichen isoelektrischen Punkts beider Peptide. Im Gegensatz zu Uroguanylin ist jedoch nicht zu erkennen, dass der STh entsprechende Elutionsgipfel eine Schulter hätte bzw. mit einem anderen Elutionsgipfel überlagern würde.

Die massenspektrometrische Analyse des isolierten Elutionsgipfels aus einer  $^{15}\text{N}$ -markierten Probe zeigt Signale bei 663,7 Da und bei 2065,5 Da (Abb. 4.18 A). Während letzterer Wert fast genau dem theoretischen Molekulargewichts von  $^{15}\text{N}$ -STh (2065,3 Da) entspricht, ist die Identität der kleineren Masse ungeklärt. Offenbar handelt es sich um eine Verunreinigung, jedoch entspricht die Masse weder den vorhergesagten Spaltprodukten von Prouro-STh noch den durch Autoproteolyse von Trypsin entstandenen Peptiden.

Ähnlich wie schon für Uroguanylin wurde auch für STh das Vorliegen von Disulfidbrücken überprüft, indem das Peptid mit DTT reduziert wurde und sein Massenspektrum mit dem der ursprünglichen Probe verglichen wurde (Abb. 4.18 B). Dabei ergibt sich eine Massenzunahme durch die Reduktion von insgesamt 6 Da, so dass davon ausgegangen werden kann, dass in dem gereinigten Peptid 3 Cystine vorliegen.

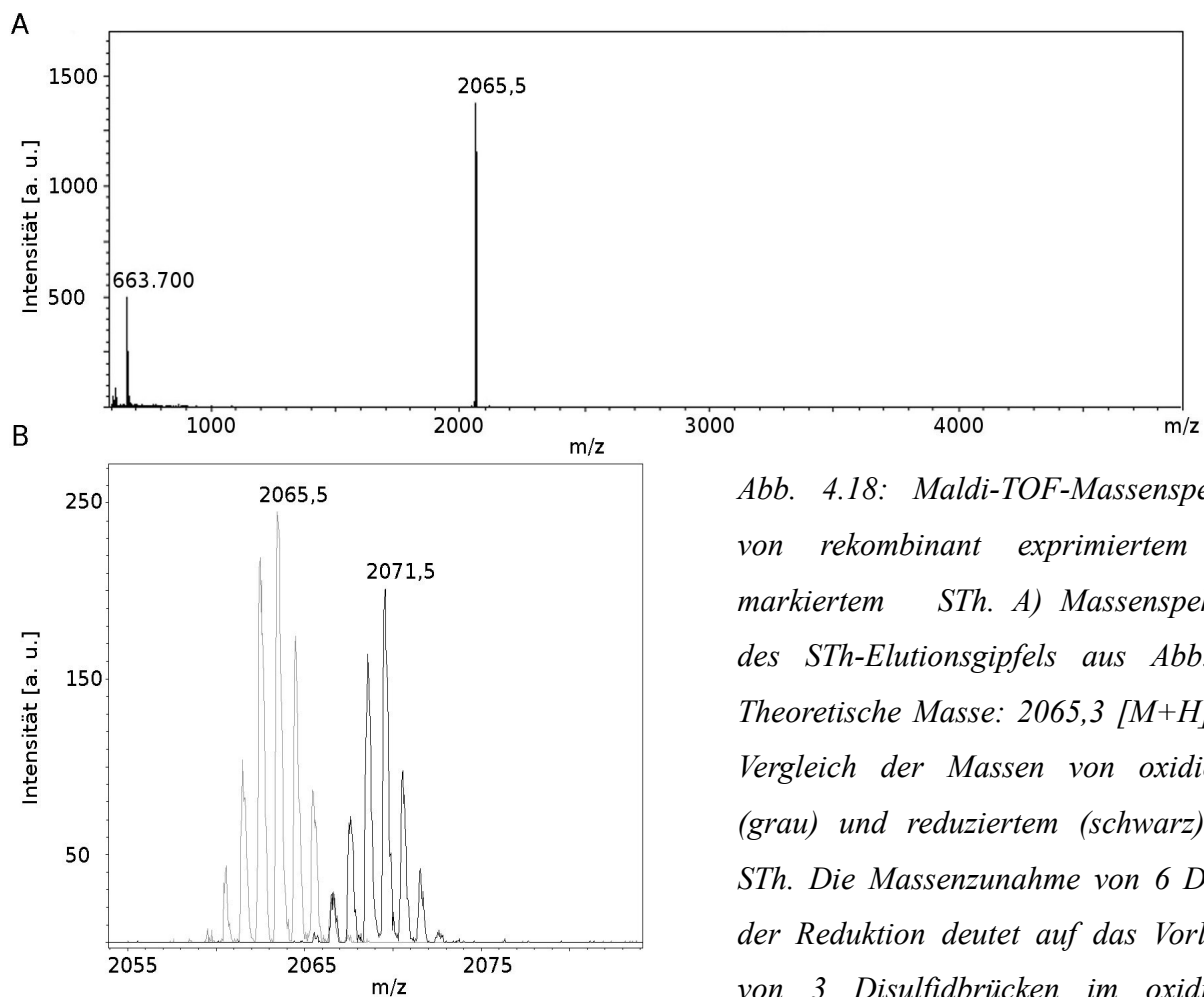


Abb. 4.18: Maldi-TOF-Massenspektren von rekombinant exprimiertem  $^{15}\text{N}$ -markiertem STh. A) Massenspektrum des STh-Elutionsgipfels aus Abb. 17. Theoretische Masse: 2065,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . B) Vergleich der Massen von oxidiertem (grau) und reduziertem (schwarz)  $^{15}\text{N}$ -STh. Die Massenzunahme von 6 Da bei der Reduktion deutet auf das Vorliegen von 3 Disulfidbrücken im oxidierten Peptid hin. Die sichtbare Isotopenverteilung ist ein Resultat der nicht zu 100 % erfolgten  $^{15}\text{N}$ -Markierung (Weiglmeier et al., 2013).

#### 4.2.6 NMR-Spektroskopie mit rekombinantem STh

Zur näheren Charakterisierung des gereinigten STh wurden NMR-Spektren aufgenommen. Als Hinweis auf die Identität des Peptids wurden Protonenresonanzen mit Werten aus der Literatur verglichen. Chemisch synthetisiertes STh wurde bereits in einigen anderen Studien NMR-spektroskopisch untersucht (Garipey *et al.*, 1986; Matecko *et al.*, 2008). Jedoch handelte es sich dabei stets um das verkürzte Peptid STh(6-19), das zwar die toxische Domäne, nicht aber den N-Terminus enthält. Dies schränkt die Vergleichbarkeit der Literaturwerte mit den hier gemessenen

Signalen ein Stück weit ein, da davon auszugehen ist, dass die Gegenwart von 5 zusätzlichen Resten, inklusive einer aromatischen Aminosäure, die chemischen Verschiebungen innerhalb der toxischen Domäne beeinflusst. Da die Struktur der Kernregion von STh aber durch die dreifache Disulfidverbrückung besonders stabilisiert wird, ist nicht zu erwarten, dass das Vorliegen oder Fehlen des N-Terminus einen deutlichen Einfluss auf die Konformation der restlichen Peptidkette hat. Vorausgesetzt, dass das rekombinant hergestellte Peptid die korrekte Struktur und Disulfidverbrückung hat, sollten dessen Resonanzsignale den Literaturwerten ähneln.

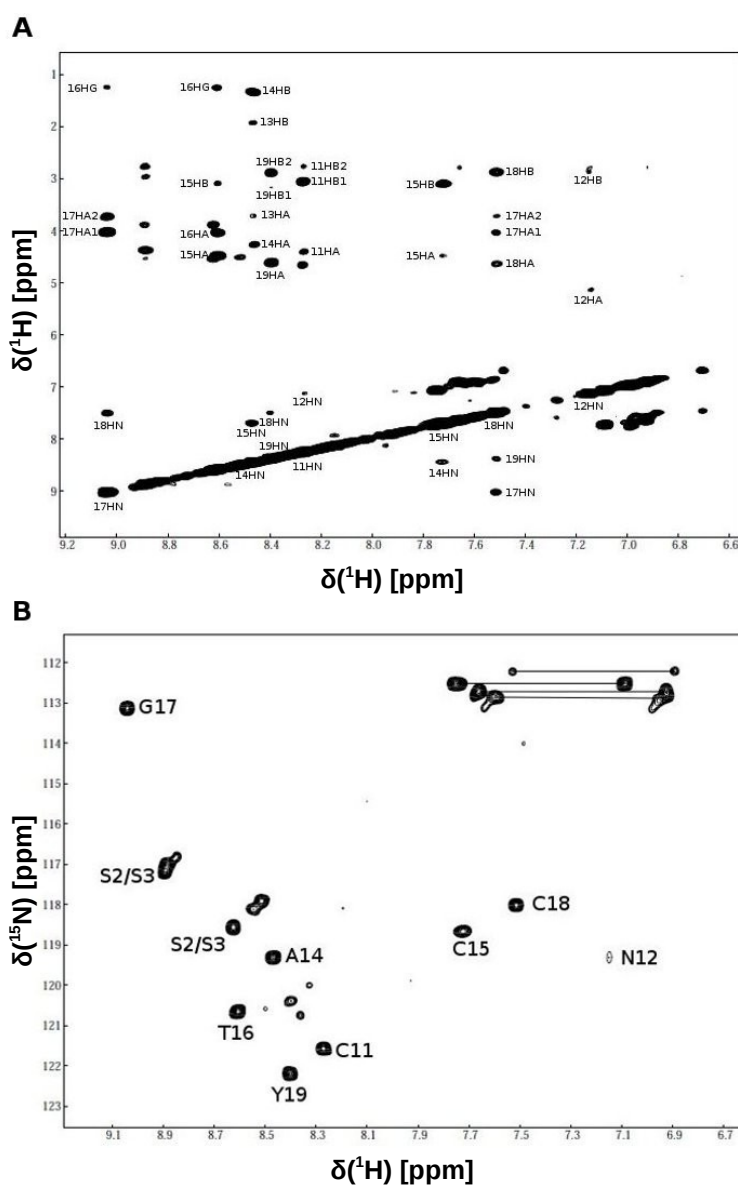


Abb. 4.19: NMR-Spektren von rekombinant hergestelltem  $^{15}\text{N}$ -markiertem STh. Die Probe enthielt  $120\ \mu\text{M}$  Enterotoxin in  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 3,0 und wurde bei  $25\ ^\circ\text{C}$  gemessen. A)  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -NOESY-HSQC, gezeigt ist die Projektion des Spektrums auf seine  $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -Ebene. Kreuz- und Diagonalsignale der Amidprotonen sind, soweit sie zugeordnet werden konnten, mit ihrer Sequenzposition und ihrer Position in der jeweiligen Aminosäure beschriftet.

B)  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC der Probe. Die Resonanzen des Peptidrückgrats sind beschriftet mit der zugehörigen Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code und der Sequenzposition. Signale der Seitenketten von Asparagin und Glutamin sind mit Linien gekennzeichnet.



Ausschnitte der von rekombinantem STh gemessenen Spektren sind in Abb. 4.19 dargestellt. Insgesamt zeigen die Spektren von rekombinantem STh eine große Dispersion der chemischen Verschiebungen, von 7,1 bis 9,0 ppm, die größer ist als etwa bei Uroguanylin (Abb. 4.10). Dies geht auf den als Ringstrom-Effekt bezeichneten magnetischen Einfluss der im Peptid enthaltenen aromatischen Aminosäuren Y5 und Y19 in Verbindung mit der, im Gegensatz zu ungefalteten Peptiden, ausgeprägten Strukturierung der disulfidverbrückten Domäne zurück.

Auffallend an den Spektren ist die für ein 19-Aminosäure-Peptid geringe Zahl an detektierten Resonanzsignalen, v. a. im  $^{15}\text{N}$ -NOESY-Spektrum (Abb. 4.19 A). Das  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC zeigt, dass es große Intensitätsunterschiede zwischen den Signalen gibt (Abb. 4.19 B). NMR-Studien an STh(6-19) haben bereits gezeigt, dass insbesondere der N-terminale Teil des Peptids aufgrund ungünstiger dynamischer Eigenschaften nur stark verbreiterte, und deshalb wenig intensive Resonanzsignale liefert, deren Zuordnung nicht oder nur schwer möglich ist (Garipey *et al.*, 1986; Matecko *et al.*, 2008).

Die Zuordnung der Resonanzen des rekombinanten STh erfolgte unter Verwendung von TOCSY und NOESY-Experimenten, wie bereits für Uroguanylin beschrieben (Kapitel 4.1.6). Auf diese Weise gelang die Zuordnung von Protonen der Aminosäuren C11 bis Y19, also des C-terminalen Teils des Peptids. Den restlichen Aminosäuren konnten mangels auswertbarer NOESY-Kreuzsignale keine Resonanzen zugeordnet werden. Basierend auf den charakteristischen chemischen Verschiebungen ihrer beta-Protonen konnten die beiden Serin-Reste des N-Terminus, S-2 und S-3, identifiziert werden, jedoch erlauben die NOESY-Spektren nicht die Bestimmung der genauen Sequenzposition. Vergleicht man die zugeordneten chemischen Verschiebungen mit Werten aus der Literatur (Matecko *et al.*, 2008), so zeigt sich, eine weitgehende Übereinstimmung (siehe Anhang, Kap. 10.1.13). Kleinere Abweichungen können durch die Gegenwart der N-terminalen Aminosäuren und durch geringfügige Abweichungen der Messbedingungen erklärt werden.

#### 4.2.7 Biologische Aktivität von rekombinantem Uroguanylin und STh

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität der gereinigten rekombinanten Peptide Uroguanylin und STh muss ihre Wirkung auf die von GC-C vermittelte Signaltransduktion quantifiziert werden. T84-Zellen sind eine Adenocarcinoma-Zelllinie die von metastatischem Darmkrebs-Gewebe abgeleitet ist (Dharmasathaphorn *et al.*, 1984). Sie exprimieren in hohem Maße GC-C, jedoch keine anderen Guanylatzyklasen (Singh *et al.*, 1991). Werden T84-Zellen der extrazellulären Stimulierung durch die Peptide Uroguanylin und STh ausgesetzt, so kommt es intrazellulär zur Akkumulation

von cGMP, dessen Quantifizierung einen Rückschluss auf die Aktivität der Peptid-Agonisten erlaubt.

T84-Zellen wurden in 24-Well-Kulturgefäßen bis zur Ausbildung einer konfluenten Zellmonolayer kultiviert und dann für 1 Stunde mit verschiedenen Konzentrationen (10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM) der gereinigten Peptide sowie mit chemisch-synthetisch hergestelltem STh(6-19) als Kontrolle versetzt (siehe Kap. 3.21.3). Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 1 M HCl hydrolysiert. Die cGMP-Konzentrationen in den sauren Überständen wurden durch einen Immunoaffinitäts-Assay (Kap. 3.21.3) bestimmt (Abb. 4.20).

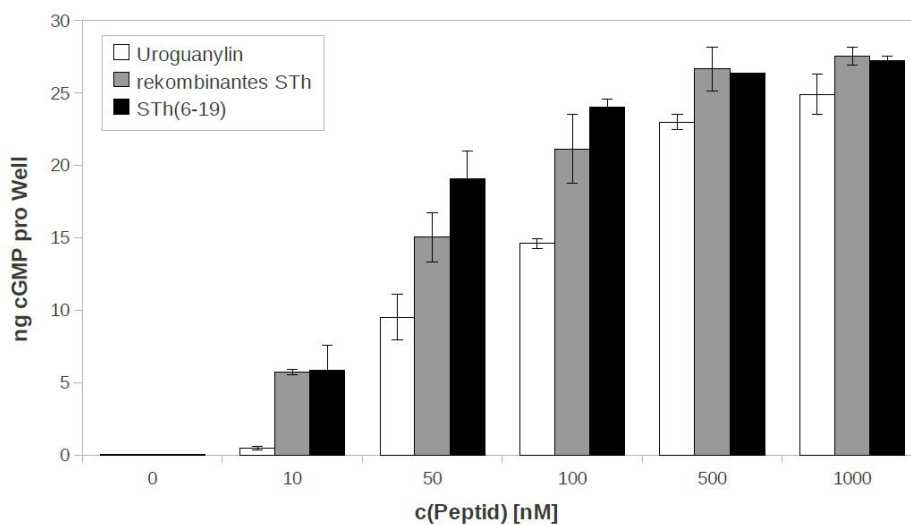


Abb. 4.20: In vitro Aktivitätstest mit T84-Zellen. Uroguanylin, rekombinantes STh und chemisch synthetisiertes STh(6-19) wurden in verschiedenen Konzentrationen dem extrazellulären Medium der Zellen zugesetzt. Nach 1 Stunde Inkubation wurden die Zellen lysiert und der intrazelluläre cGMP-Gehalt bestimmt. Aufgetragen sind jeweils das arithmetische Mittel aus zwei durchgeführten Messungen. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Abweichungen der Messwerte voneinander (Weiglmeier et al., 2013).

Dabei zeigt sich für die beiden rekombinant hergestellten Peptide und für das als Positivkontrolle verwendete STh(6-19) eine konzentrationsabhängige Zunahme der im Überstand nachgewiesenen cGMP-Menge. Sowohl Uroguanylin als auch STh sind also in der Lage, die Guanylatzyklase C zu aktivieren. Vor allem im Bereich der niedrigen Peptidkonzentrationen 10 – 100 nM ist deutlich zu erkennen, dass die aktivierende Wirkung von Uroguanylin schwächer ist als bei STh. Dies steht in Einklang mit der im Vergleich zu STh schwächeren Bindung von Uroguanylin an GC-C (Hamra *et al.*, 1997).

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, inwieweit sich die STh-Peptidsequenz *in vitro* spontan, d. h. unabhängig von der verwendeten Prosequenz, zum biologisch aktiven Peptid falten kann. Dazu wurde das gereinigte STh mit DTT reduziert. Anschließend wurde durch Zugabe eines Überschusses von oxidiertem Glutathion (GSSG) und zweitägiger Inkubation eine oxidative disulfid-gekoppelte Faltung des Peptids unter Ausbildung der nativen Struktur versucht. Die Konzentrationen von DTT und GSSG wurden so gewählt, dass in der Lösung ein Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion von 1 : 2 vorlag. Bei Studien mit  $\omega$ -Conotoxinen konnte gezeigt werden, dass sich die reduzierten Peptide unter vergleichbaren Bedingungen mit Ausbeuten im Bereich von 16 – 50 % zu den nativen Conotoxinen falten (Price-Carter *et al.*, 1996a; Price-Carter *et al.*, 1996b).  $\omega$ -Conotoxine sind ebenfalls cysteinreiche Peptide und sind, was Größe und Disulfidverbrückungsmuster angeht, den hitzestabilen Enterotoxinen sehr ähnlich. Um die Ausbildung der nativen STh-Struktur bei der Reoxidation zu überprüfen wurde sowohl mit den reduzierten als auch mit den reoxidierten Toxinen der beschriebene T84-basierte *in vitro* Aktivitätstest durchgeführt (Abb. 4.21).

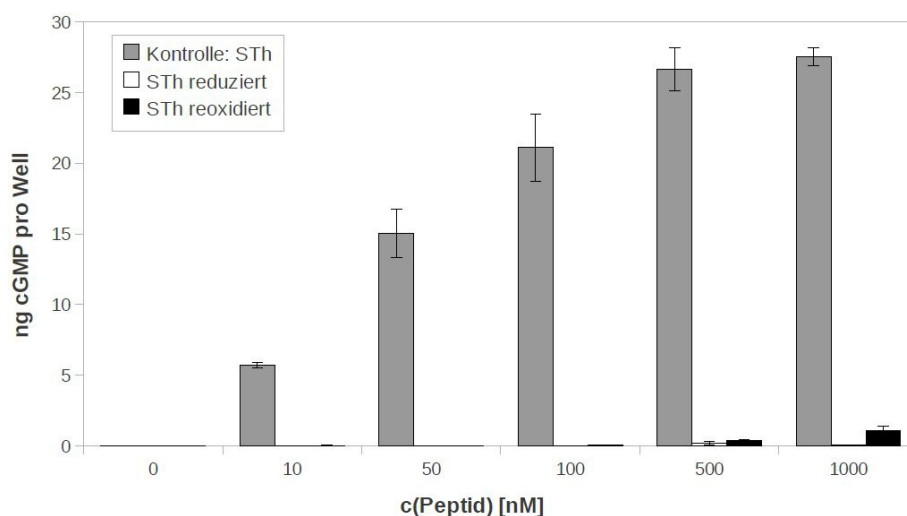


Abb. 4.21: In vitro Aktivitätstest mit reduziertem (weiß) und reoxidiertem STh (schwarz). Als Kontrolle wurde rekombinant hergestelltes STh (grau) verwendet. Die Reduktion wurde mit DTT durchgeführt, die Reoxidation erfolgte in Gegenwart von GSSG und GSH (Verhältnis [GSSG]:[GSH] = 1:2). Bei den aufgetragenen Daten handelt es sich um das arithmetische Mittel aus jeweils 2 gemessenen Werten, deren Abweichungen voneinander durch die Fehlerbalken gekennzeichnet sind.

Das Ergebnis des Tests zeigt deutlich, dass eine spontane Faltung des Peptids zur biologisch aktiven Form unter oxidativen Bedingungen nur in äußerst geringem Ausmaß erfolgt. Im Vergleich zu der

verwendeten Positivkontrolle, dem rekombinant gereinigten STh, führt die reduzierte Probe zu keiner messbaren Anregung der cGMP-Produktion, während bei der reoxidierten Probe nur hohe extrazelluläre Peptidkonzentrationen, 500 und 1000 nM, in einer geringfügigen Anreicherung von intrazellulärem cGMP resultieren.

### 4.3 Expression und Charakterisierung der mutierten Peptide Uroguanylin A3R D6E, Uroguanylin $\Delta_{TIA}$ D6E, STh L9Y und STh Y5R L9Y

Um noch weiter zu untersuchen, wie tolerant der durch die Proregion vermittelte disulfidgekoppelte Faltungsmechanismus gegenüber Variationen der Aminosäuresequenz im C-terminalen Proteinteil ist, wurden Mutanten von Prouroguanylin und ProuroSTh hergestellt. Als Leitsequenzen wurden dabei die beiden Wirkstoffe Linaclotide und Plecanatide gewählt (Abb. 1.7). Beide Peptide wurden bereits in klinischen Studien zur Behandlung von chronischer Verstopfung und IBS-C untersucht und ihre biologische Aktivität ist gesichert (Lembo *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2009). Abb. 4.22 zeigt eine schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte.

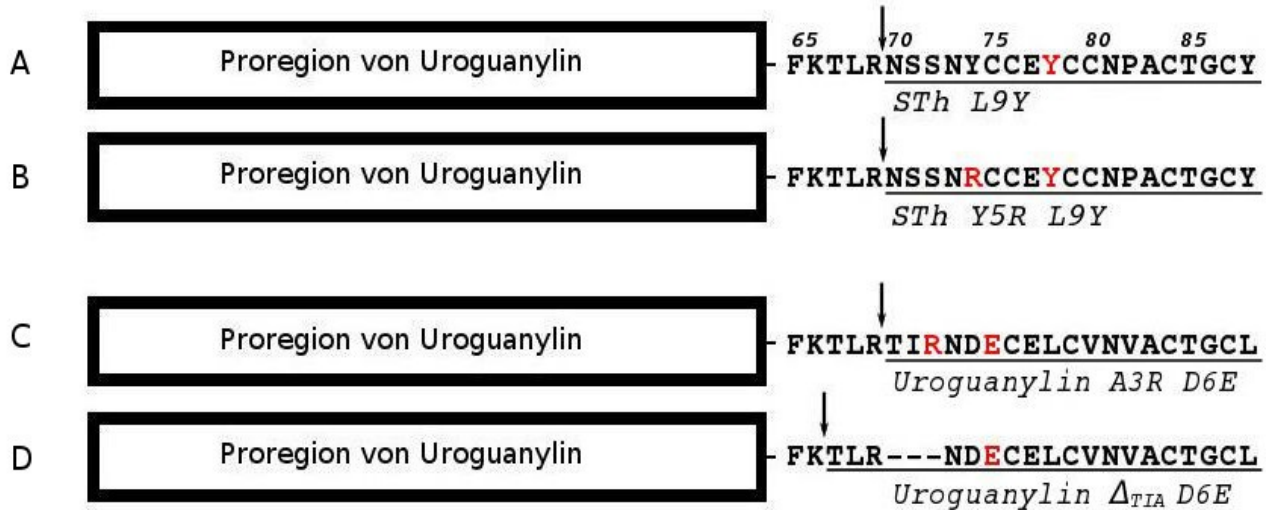


Abb. 4.22: Sequenzvergleich der von Prouroguanylin und Prouro-STh abgeleiteten mutierten Vorläuferproteine A) Prouro-STh L78Y, B) Prouro-STh Y74R L78Y, C) Prouroguanylin A72R D75E und D) Prouroguanylin  $\Delta(70-72)$  D75E. Aminosäuren, die von den nativen Sequenzen von Prouroguanylin bzw. Prouro-STh abweichen, sind rot dargestellt. Pfeile markieren die experimentell ermittelten Trypsin-Schnittstellen. Die Hormon- bzw. Toxinregionen sind unterstrichen.

Linaclotide unterscheidet sich von STh durch die Sequenzvariation L9Y sowie durch das Fehlen der 5 N-terminalen Aminosäuren. Basierend auf der Sequenz von Prouro-STh wurden zwei neue Konstrukte entwickelt, deren C-terminale Region die Peptide STh L9Y bzw. STh Y5R L9Y enthält (siehe Kap. 10.1.3 und Kap. 10.1.4; Anmerkung: die Sequenzpositionen beziehen sich auf die Lage innerhalb der C-terminalen Hormon- bzw. Toxinregionen). Im zweiten Peptid sollte das an Position 5 eingeführte Arginin eine neue Trypsin-Schnittstelle erzeugen, wodurch ein mit Linaclotide identisches Peptid hergestellt werden könnte. Jedoch haben massenspektrometrische Analysen gezeigt, dass Trypsin an dieser Stelle nicht schneidet (Abb. 4.24), so dass der Effekt der Mutation in der Einführung einer positiven Ladung am N-Terminus des Peptids besteht.

Die Uroguanylin-Sequenz wurde durch die Mutationen D6E und A3R modifiziert um den Wirkstoff Plecanatide zu erhalten (siehe Kap. 10.1.5). Wie schon bei STh Y5R L9Y so diente auch in diesem Fall die Einführung des Arginins dazu, eine zusätzliche Schnittstelle zu schaffen. Jedoch zeigt sich auch hier, dass Trypsin an dieser Position nicht schneidet, so dass sich das aus diesem Konstrukt freigesetzte Peptid, das im Folgenden als Uroguanylin A3R D6E bezeichnet wird, durch drei zusätzliche N-terminale Aminosäuren, Threonin, Isoleucin und Arginin, vom in der Literatur beschriebenen Wirkstoff unterscheidet. In einem weiteren Konstrukt wurden diese drei Aminosäuren aus der Sequenz deletiert, um zu untersuchen wie sich Deletionen am C-Terminus der Prosequenz auf die Aktivität der Peptide auswirken (siehe Kap. 10.1.6). Das auf diese Weise hergestellte Peptid wurde als Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E bezeichnet.

### 4.3.1 Herstellung der Konstrukte durch ortsgerichtete Mutagenese

Zur Einführung der Punktmutationen bzw. Sequenzdeletion in Prouroguanylin und Prouro-STh wurde die QuickChange® PCR-Mutagenese (siehe Kap. 3.15.5) gewählt. Als Matrizen dienten dabei jeweils die Plasmide pET32a-Asp-pres-prouroguanylin und pET32a-Asp-pres-Prouro-STh. Die bei den einzelnen Mutageneseschritten verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Kap. 3.3 aufgelistet. Für die Substitution von L78 zu Tyrosin in Prouro-STh wurden die Oligonukleotide #1 und #2 verwendet. Das damit entstandene Konstrukt pET32a-Asp-pres-prouro-STh-L78Y wurde dann als Matrize zusammen mit den Primern #3 und #4 für die Herstellung von pET32a-Asp-pres-prouro-STh-Y74R-L78Y verwendet.

Die Konstrukte pET32a-Asp-pres-prouroguanylin-A72R-D75E und pET32a-Asp-pres-prouroguanylin- $\Delta(70-72)$ -D75E wurden durch eine zweistufige Mutagenese konstruiert. Im ersten Schritt wurde mit Hilfe der Oligonukleotidprimer #5 und #6 die D75E-Mutation in Prouroguanylin

eingeführt. Anschließend wurde in einer zweiten Mutagenese jeweils die A72R-Punktmutation (Primer #7 und #8) in pET32a-Asp-pres-prouroguanylin-A72R-D75E sowie die  $\Delta 70-72$ -Deletion (Primer #9 und #10) in pET32a-Asp-pres-prouroguanylin- $\Delta(70-72)$ -D75E erstellt.

Nach Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* XL1 Blue (siehe Kap. 3.11) wurden die Sequenzen der vier hergestellten Konstrukte jeweils durch Sequenzierung überprüft.

### 4.3.2 Expression und Reinigung der Peptide

Die Expression und Reinigung von Prouro-STh L78Y sowie Prouro-STh Y74R L78Y verlief analog zu Prouro-STh. Auch die Expression und Reinigung von Prouroguanylin A72R D75E und Prouroguanylin  $\Delta(70-72)$  D75E wurde genauso durchgeführt wie bereits für Prouroguanylin beschrieben. Während der Expression und Reinigung verhielten sich die mutierten Varianten von Prouroguanylin und Prouro-STh weitgehend ähnlich wie die Proteine, von denen sie abgeleitet sind. Jedoch wurde bei Prouroguanylin A72R D75E und insbesondere Prouroguanylin  $\Delta(70-72)$  D75E eine gegenüber Prouroguanylin deutlich verringerte Ausbeute erzielt (Kap. 5.4). Aufgrund des ähnlichen Vorgehens wird auf eine detaillierte Darstellung der Reinigung der mutierten Vorläuferproteine an dieser Stelle verzichtet.

Die C-terminalen Peptide wurden aus den gereinigten Vorläuferproteinen durch Trypsin-Verdau freigesetzt und durch Umkehrphasen-HPLC isoliert. Abb. 4.23 zeigt die HPLC-Chromatogramme der einzelnen Spaltansätze.

Da die C-terminalen Peptide aller vier Konstrukte gleich lang sind, wird ihr Elutionsverhalten im Wesentlichen durch ihre Hydrophobizität bestimmt. STh L9Y eluiert bei etwa 25 % Acetonitril von der Säule, während das durch das zusätzliche Arginin stärker geladene STh Y5R L9Y schon bei 22 % Acetonitril eluiert. Die beiden Peptide Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E und Uroguanylin A3R D6E werden dagegen von 24 % Acetonitril von der Säule gewaschen. Da die Elutionsgipfel von STh Y5R L9Y und von Uroguanylin A3R D6E beide teilweise mit anderen Elutionsgipfeln überlappen, wurden die entsprechenden Proben jeweils ein zweites Mal auf die gleiche Säule aufgetragen und von Verunreinigungen getrennt. Insbesondere bei STh Y5R L9Y schlägt sich die schwierige Trennung von den Verunreinigungen in einer deutlich verminderten Ausbeute nieder. Auch die Verwendung eines flacher ansteigenden Elutionsgradienten führte nicht zu einer Verbesserung der Trennung.

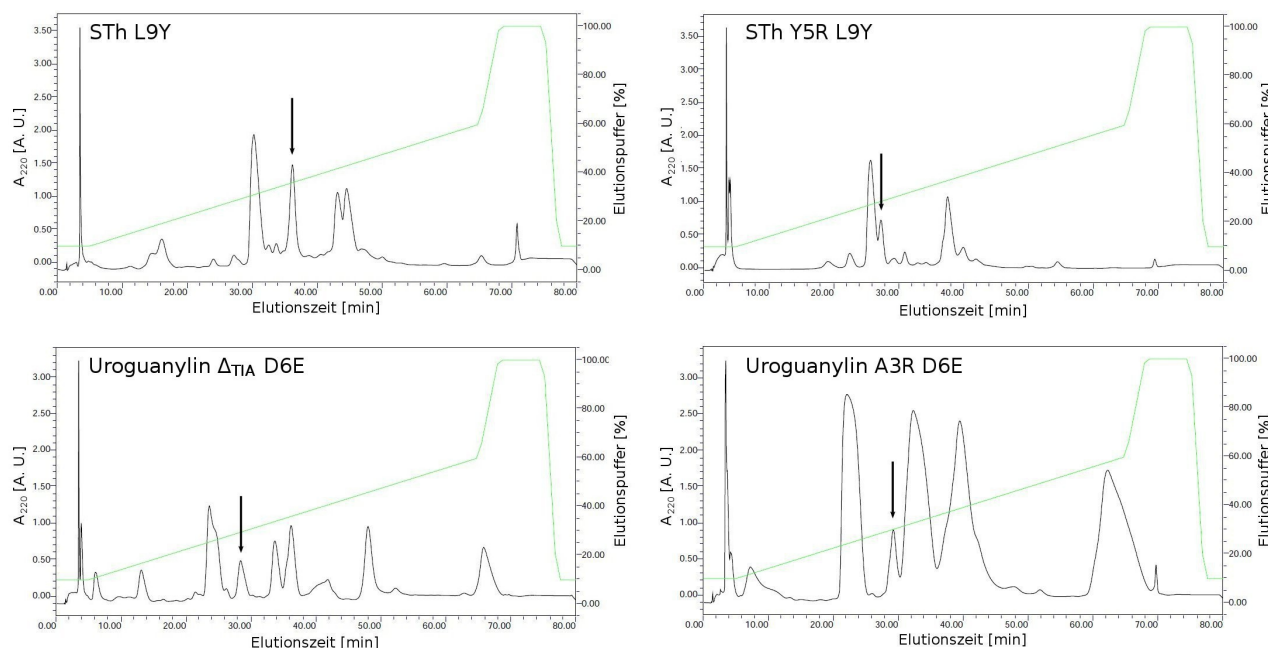


Abb. 4.23: Reinigung der Mutanten STh L9Y, STh Y5R L9Y, Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E und Uroguanylin A3R D6E durch RP-HPLC. Pfeile markieren die Elutionsgipfel, in denen die Peptide massenspektrometrisch nachgewiesen wurden. Der Gradient ist grün dargestellt. Der Elutionspuffer enthielt 70 % Acetonitril, 0,1 % TFA bei STh L9Y und 80 % Acetonitril, 0,1 % TFA bei STh Y5R L9Y, Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E und Uroguanylin A3R D6E. Masse an gespaltenem Vorläuferprotein: 9,5 mg (STh L9Y), 8,0 mg (STh Y5R L9Y), 10 mg (Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E), 16 mg (Uroguanylin A3R D6E).

### 4.3.3 Massenspektrometrie

Diejenigen Fraktionen der HPLC-Läufe, welche jeweils die C-terminalen Peptide enthalten, wurden durch Elektrospray LC-MS identifiziert. In Abb. 4.24 sind die ESI-Massenspektren von STh L9Y, STh Y5R L9Y, Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E sowie Uroguanylin A3R D6E wiedergegeben. Für STh Y5R L9Y kann durch die Massenspektren auch die erfolgreiche  $^{15}\text{N}$ -Markierung des Peptids nachgewiesen werden.

In den in Abb. 4.23 gekennzeichneten Reinigungsfraktionen konnten die C-terminalen Peptide anhand ihrer Masse nachgewiesen werden. Anhand der Massenspektren kann nicht nur gezeigt werden, dass alle Cysteine oxidiert vorliegen. Die experimentell gefundenen Massen erlauben auch die Bestimmung der Sequenzlänge, so dass die in Abb. 4.22 gekennzeichneten Trypsin-Schnittstellen identifiziert werden können. Es zeigt sich, dass die in STh Y5R L9Y und Uroguanylin

A3R D6E zusätzlich eingeführten Arginine nicht zur Entstehung neuer Trypsin-Schnittstellen führen und sich die Peptide auf diese Weise nicht verkürzen lassen. Außerdem führt die  $\Delta(70-72)$ -Deletion in Prouroguanylin  $\Delta(70-72)$  D6E dazu, dass Trypsin die Peptidkette nicht mehr C-terminal von R-69, sondern C-terminal von K-66 hydrolysiert. Offensichtlich ist die Protease bei von STh und Uroguanylin abgeleiteten Peptiden nicht in der Lage, in der Nähe der disulfidverbrückten Kernregion zu spalten.

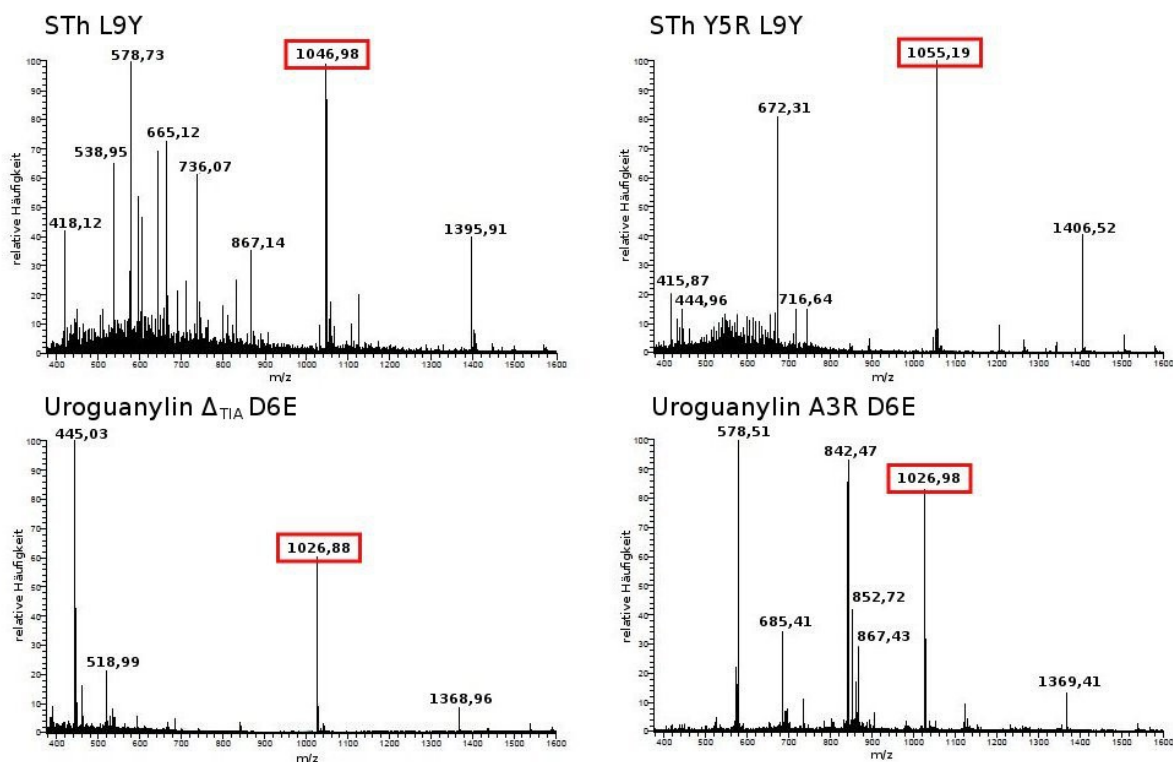


Abb. 4.24: ESI-Massenspektren von rekombinant gereinigtem STh L9Y, STh Y5R L9Y ( $^{15}\text{N}$ -markiert), Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E und Uroguanylin A3R D6E. Die theoretischen Massen der Peptide ( $[M+2H]^{2+}$ ) sind: 1047,15 (STh L9Y), 1055,15 ( $^{15}\text{N}$ -STh Y5R L9Y), 1027,15 (Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E und Uroguanylin A3R D6E). Experimentell gefunden Massen die mit diesen Werten gut übereinstimmen sind rot gekennzeichnet.

In allen vier in Abb. 4.24 gezeigten Massenspektren können eine Reihe von Verunreinigungen nachgewiesen werden. Diese detektierten Massen stimmen weder mit Fragmenten aus der zu erwartenden Autoproteolyse von Trypsin überein noch entsprechen sie den anderen durch



tryptischen Verdau der jeweiligen Vorläuferproteine entstehenden Peptiden.

#### 4.3.4 Charakterisierung von STh L9Y und STh Y5R L9Y

Sowohl STh L9Y als auch STh Y5R L9Y wurden  $^{15}\text{N}$ -markiert, so dass  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von beiden Peptiden aufgenommen werden konnten. Die Zuordnung von Rückgratamidensignalen von STh L9Y erfolgte unter Verwendung von NOESY-Spektren (Abb. 4.25 A). Dies war für STh Y5R L9Y nicht möglich, da das Peptid nur in geringen Mengen hergestellt werden konnte (Kap. 3.2). Die Zuordnung von Signalen im HSQC-Spektrum von STh Y5R L9Y (Abb. 4.25 B) erfolgte durch Vergleich mit den Spektren von STh L9Y und STh (Abb. 4.20 B).

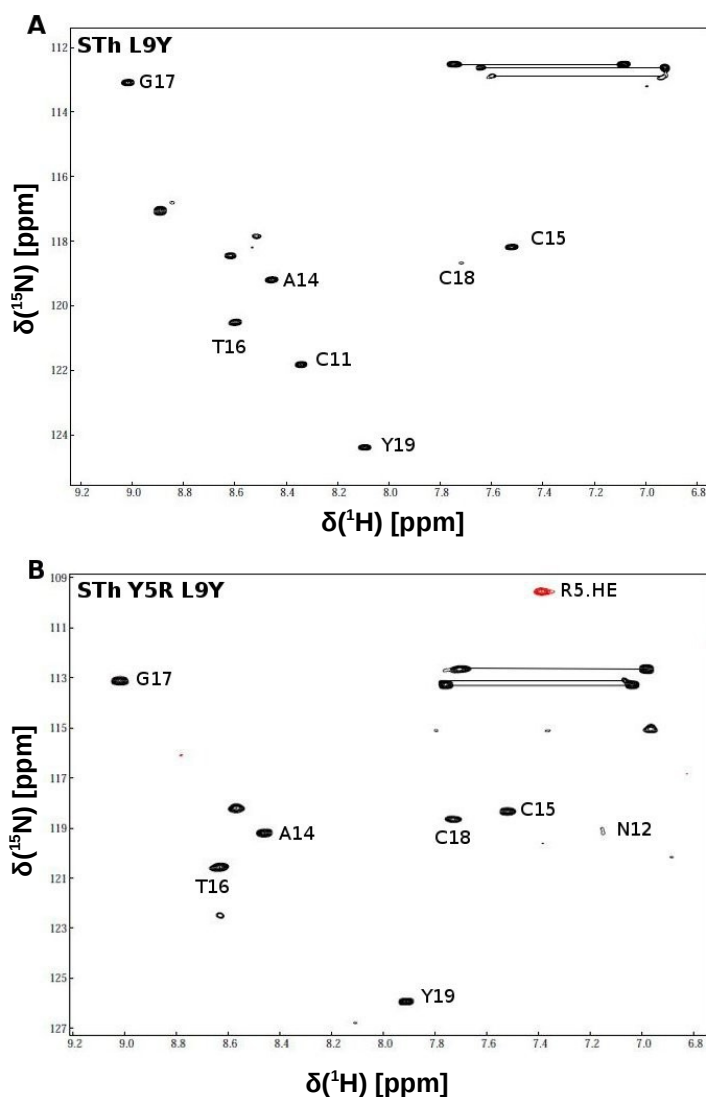


Abb. 4.25:  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -markiertem A) STh L9Y und B) STh Y5R L9Y. Die Proben enthielten  $109\ \mu\text{M}$  STh L9Y bzw.  $35\ \mu\text{M}$  STh Y5R L9Y und wurden in  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 3,0 bei  $10\ ^\circ\text{C}$  gemessen. Die Resonanzen des Peptidrückgrats sind beschriftet mit der zugehörigen Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code und der Sequenzposition. Das gefaltete Signal der Seitenkette von R-5 ist rot dargestellt. Seitenketten-signale der Asparagine sind durch Linien verbunden.

Zwar deuten die Massenspektren beider Peptide auf Verunreinigungen der Proben hin, jedoch sind in den gemessenen HSQC-Spektren kaum intensive Signale zu erkennen, die nicht auch in den STh-Spektren gemessen wurden (Abb. 4.20), so dass trotzdem eine relative hohe Reinheit angenommen werden kann. Dies gilt aufgrund des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nur bedingt für STh Y5R L9Y.

Die Lage der Rückgratamidssignale in den Spektren von STh L9Y, STh Y5R L9Y und STh (Abb. 4.20 B) ist sehr ähnlich, so dass angenommen werden kann, dass alle drei Peptide die gleiche Konformation und Disulfidverbrückung aufweisen. Geringfügige Abweichungen der bekannten Signale können auf den Einfluss der Seitenketten der mutierten Aminosäuren zurückgeführt werden. Die Aktivität der mutierten STh-Analoga wurde in einem *in vitro* Test bestimmt (Abb. 4.26). Dabei wurde, wie schon für Uroguanylin und Wildtyp-STh (Abb. 4.21), der bei T84-Zellen durch die Peptide stimulierte Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration quantifiziert.

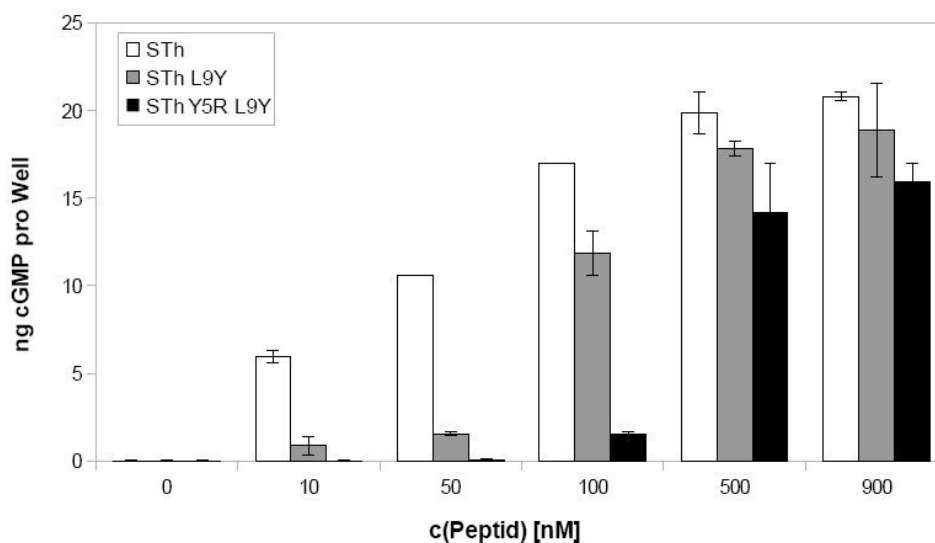


Abb. 4.26: In vitro Aktivitätstest mit T84-Zellen. STh L9Y, STh Y5R L9Y sowie STh als Kontrolle wurden jeweils in den Konzentrationen 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM und 900 nM dem extrazellulären Medium der Zellen zugesetzt. Nach 1 Stunde Inkubation wurde die von den Peptiden stimulierte intrazelluläre cGMP-Produktion bestimmt. Aufgetragen ist das arithmetische Mittel aus je zwei durchgeführten Messungen. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Abweichungen der Messwerte voneinander.

In Abb. 4.26 fällt auf, dass v. a. bei niedrigen Konzentrationen (10 – 100 nM) die mutierten STh-Analoga nur eine gegenüber dem Wildtyp deutlich reduzierte cGMP-Produktion anregen. Außerdem ist der gemessene cGMP-Anstieg bei STh L9Y stärker und setzt früher ein als bei STh

Y5R L9Y. Offenbar verringern beide Punktmutationen, L9Y und Y5R, die Aktivität des Enterotoxins. Dieses Ergebnis bestätigt, dass der Propeptid-vermittelte Faltungsmechanismus von STh auch Mutationen innerhalb der Enterotoxinsequenz und selbst die Einführung einer positiven Ladung toleriert. Weiterhin zeigt Abb. 4.26, dass die Aktivität von STh durch bestimmte Punktmutationen beeinflusst werden kann.

#### 4.3.5 Aktivität von Uroguanylin A3R D6E und Uroguanylin $\Delta_{TIA}$ D6E

Für STh hat sich gezeigt, dass die Einführung von Punktmutationen nicht zu einem gänzlichen Verlust der Aktivität des Peptids führt. Um dies auch für Uroguanylin zu überprüfen wurden die Aktivitäten von Uroguanylin A3R D6E und Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E bestimmt (Abb. 4.27). Ein Vergleich der Ergebnisse von Uroguanylin A3R D6E und Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E erlaubt außerdem eine Aussage über den Einfluss von Sequenzen, die im Vorläuferprotein N-terminal von der Hormonsequenz liegen, auf den Mechanismus der Faltung. Wie in Abb. 4.22 schematisch dargestellt, wurde im Konstrukt Prouroguanylin  $\Delta(70-72)$  D6E die TIA-Sequenz, d. h. die Sequenzposition 70-72 von Prouroguanylin, deletiert.

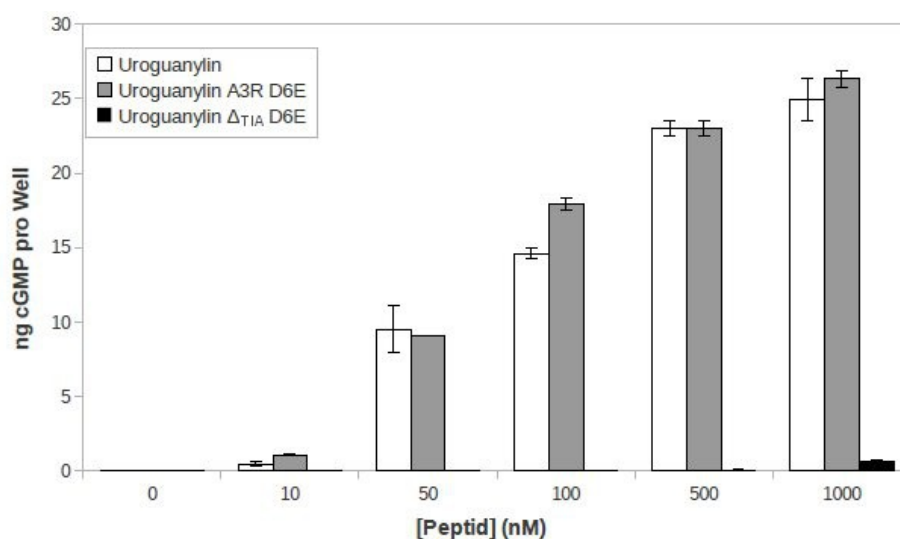


Abb. 4.27: In vitro Aktivitätstest mit T84-Zellen. Uroguanylin A3R D6E, Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E und Uroguanylin wurden jeweils in verschiedenen Konzentrationen im Nährmedium der Zellen gelöst. Nach 60-minütiger Inkubation wurde die intrazelluläre cGMP-Konzentration bestimmt. Die dargestellten Werte entsprechen jeweils dem arithmetische Mittel aus zwei durchgeführten Messungen. Abweichungen der Messwerte voneinander sind durch die Fehlerbalken angedeutet.

Die Ergebnisse des *in vitro* Aktivitätstest zeigen, dass Uroguanylin A3R D6E eine mit Uroguanylin vergleichbare Aktivität besitzt. Weder die Mutation D6E noch die durch das Arginin an Position 3 zusätzlich eingeführte positive Ladung führen zu einer signifikanten Verringerung oder Steigerung der Aktivität. Gleichzeitig wurde für das Peptid Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E überhaupt keine biologische Aktivität nachgewiesen. Die Deletion der drei Aminosäuren T70, I71 und A72 in Prouroguanylin führt also dazu, dass das C-terminal davon gelegenen Hormon nicht mehr gefaltet werden kann. Auch die Lösungsstruktur von Proguanylin (Lauber *et al.*, 2003) legt nahe, dass die Aminosäuren, die N-terminal der Hormonregion liegen, unerlässlich für die korrekte Orientierung derselben im Gesamtprotein sind.

#### 4.4 Extrazelluläre Fragmente von GC-C

Die Verfügbarkeit der verschiedenen Peptidliganden ist eine wichtige Grundvoraussetzung für die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Ligandenerkennung und der konformationellen Signaltransduktion innerhalb von GC-C. Für die Durchführung von Bindungsstudien ist es ebenso wichtig, die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne funktional exprimieren zu können. Parallel zur Etablierung des Expressionssystems für die disulfidverbrückten Agonisten wurde versucht, Fragmente von GC-C zu exprimieren, welche das für deren Bindung notwendige extrazelluläre Erkennungsmotiv enthalten.

Zwar gibt es relativ einfach zu kultivierende humane Zelllinien, welche GC-C exprimieren, etwa T84 Zellen oder Caco2 Zellen (Singh *et al.*, 1991; Waldman *et al.*, 1998). Jedoch stellt die Reinigung des 1050 Aminosäuren umfassenden Proteins aus diesen Quellen keine befriedigende Strategie zur Gewinnung von Proben für Bindungsstudien dar. In den genannten Zelltypen wird GC-C nur mit äußerst geringen Expressionsraten exprimiert, so dass nur kleine Mengen nicht homogenen Proteins isoliert werden könnten. Biophysikalische Analysemethoden, wie NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie, erfordern jedoch relativ große Mengen reinen und homogenen Proteins, was nur durch rekombinante Expressionsmethoden erreichbar ist. Außerdem ist GC-C ein Transmembranprotein und kann nicht ohne weiteres in wässriger Lösung solubilisiert werden. Jedoch besteht die Chance, dass die isolierte extrazelluläre Domäne, oder geeignete Fragmente derselben, eine für die Untersuchung ihrer Bindungseigenschaften ausreichende Löslichkeit haben.

#### 4.4.1 Expression und Charakterisierung von MiniGC-C

Da die gesamte extrazelluläre Domäne (ECD) von GC-C mit 407 Aminosäuren relativ groß für NMR-spektroskopische Untersuchungen ist, wäre es von Vorteil, ein kleineres Fragment der ECD zu identifizieren, welches das Ligandenbindungsmotiv enthält und isoliert exprimiert werden kann. Allerdings muss dieses Fragment nicht nur löslich sein, sondern auch in seiner isolierten Form annähernd die Struktur einnehmen, welche es im Kontext des Gesamtproteins hat, so dass die strukturellen Voraussetzungen für die Ligandenbindung weiterhin gegeben sind.

Das Konstrukt MiniGC-C, das der isolierten membran-proximalen Subdomäne der ECD von GC-C entspricht (Kapitel 1.5.3), ist mit einer Länge von nur 197 Aminosäuren ein vielversprechender Kandidat für die Durchführung von Bindungsstudien mit STh oder Uroguanylin. Für das von GC-C aus Schweinen (*Sus scrofa*) abgeleitete MiniGC-C wurde gezeigt, dass es sich unabhängig falten kann und in für NMR-Studien ausreichenden Mengen rekombinant hergestellt werden kann (Lauber *et al.*, 2009; Tidten, 2003). Darüber hinaus wurde eine Wechselwirkung zwischen porzinem MiniGC-C und dem hitzestabilen Enterotoxin STp nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde zunächst versucht, die humane Variante von MiniGC-C zu exprimieren und zu reinigen und anschließend die Bindung zwischen MiniGC-C und hitzestabilem Enterotoxin STh bzw. Uroguanylin zu reproduzieren.

##### 4.4.1.1 Expression in Origami B (DE3)

Da MiniGC-C laut dem Strukturmodell (siehe Kap. 1.5.3) über eine Disulfidbrücke verfügt, wurde es in *E. coli* Origami B (DE3) exprimiert (siehe Kap. 3.22). Um die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen wurde ein N-terminaler NusA-Löslichkeitsanhang verwendet, der durch PreScission-Protease abspaltbar ist. Für die Expression wurde das Plasmid pET43.1a-NusA-C489A-miniGC-C verwendet. Da NusA über unverbrückte Cysteine verfügt, ist in diesem Konstrukt der für den Löslichkeitsanhang kodierende Expressionsvektor pET43.1a durch ortsgerichtete Mutagenese so verändert worden, dass das C-terminal, und damit dem Fusionspartner MiniGC-C am nächsten liegende, Cystein 489 von NusA durch Alanin ersetzt ist. Dadurch wird die Gefahr einer Fehlverbrückung innerhalb des Fusionsproteins minimiert.

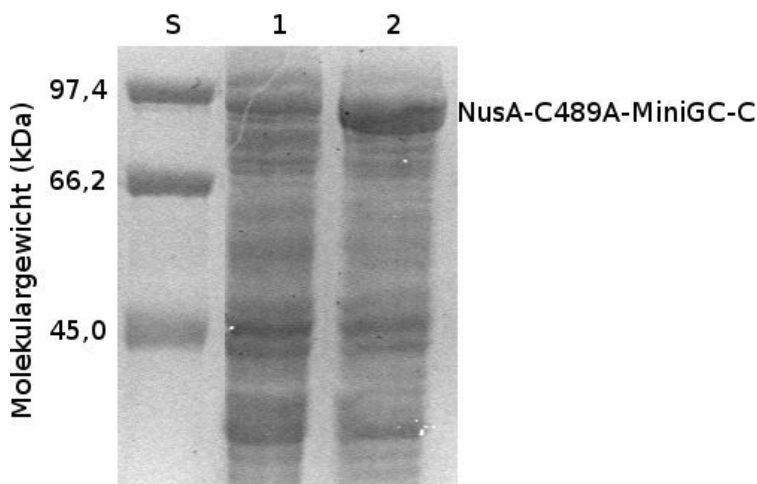


Abb. 4.28: Expression von NusA-C489A-MiniGC-C in *E. coli* Origami B (DE3). Die Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert. Zellproben wurden auf ein 10 % SDS-Acrylamid-Induktionsgel aufgetragen. S: low range Proteinstandard; 1: Zellpellet vor Induktion; 2: Zellpellets 5 h nach Induktion.

Das Plasmid pET43.1a-NusA-C489A-miniGC-C wurde durch Elektroporation in *E. coli* Origami B (DE3) transformiert und positive Klone wurden auf Ampicillin-haltigem LB-Agar selektiert. Positive Kolonien wurden verwendet um LB-Flüssigkulturen anzupflanzen. Bei einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,7$  wurde die Expression des Fusionsproteins durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte bei 25 °C für 5 h. Anschließend wurden die Zellen geerntet.

Abb. 4.28 zeigt das SDS-Gel zur Analyse der Expression von NusA-C489A-MiniGC-C. Das Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von 82,6 kDa. 6 Stunden nach dem Beginn der Induktion zeigt sich ein starke Bande bei etwa 80 kDa, die dem exprimierten Fusionsprotein NusA-C489A-MiniGC-C entspricht.

Bei der Herstellung  $^{15}\text{N}$ -markierter Proben wurden die Bakterien in  $^{15}\text{N}$ -angereichertem M9-Medium kultiviert. In M9-Medium erfolgte die Proteinexpression über Nacht und dauerte etwa 15 h, die Kultivierung verlief ansonsten aber unter den gleichen Bedingungen wie in LB.

#### 4.4.1.2 Reinigung von MiniGC-C

Nach der Ernte wurden die Zellen am Microfluidizer aufgeschlossen und der Zellextrakt gelelektrophoretisch analysiert. Es zeigte sich, dass NusA-C489A-MiniGC-C v. a. in der löslichen Fraktion des Lysats nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.29 B, Bahn 2). Da das Fusionsprotein über einen Hexahistidin-Anhang verfügt, erfolgte seine weitere Reinigung durch Nickelionen-Affinitätschromatographie. In Abb. 4.29 A ist das Chromatogramm der Reinigung abgebildet. Bei 25 mM Imidazol eluieren im Wesentlichen Verunreinigungen, u. a. ein Protein das mit einem beobachtbaren Molekulargewicht von etwa 70 kDa eine ähnlich Größe hat wie das Fusionsprotein.

Weitere Analysen dieser Fraktionen haben jedoch gezeigt, dass sie nur sehr geringe Mengen NusA-C489A-MiniGC-C enthalten. In Fraktionen, die einer Imidazolkonzentration von 100 mM und 200 mM Imidazol entsprechen, kann im SDS-Gel eine Bande bei etwa 80 kDa nachgewiesen werden, die dem Fusionsprotein entspricht (Abb. 4.29 B).

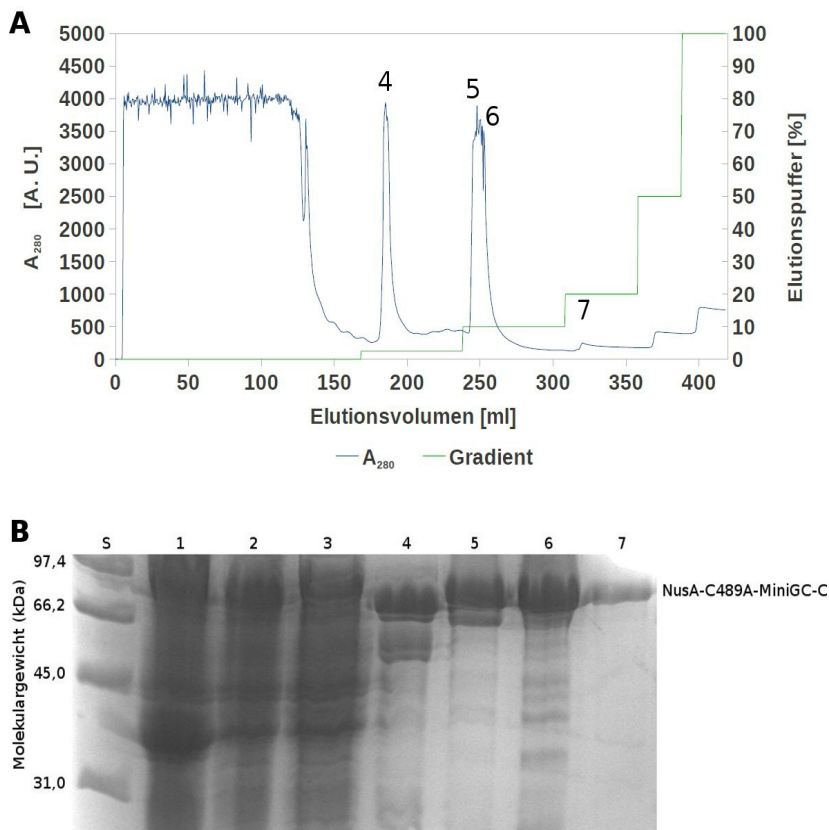


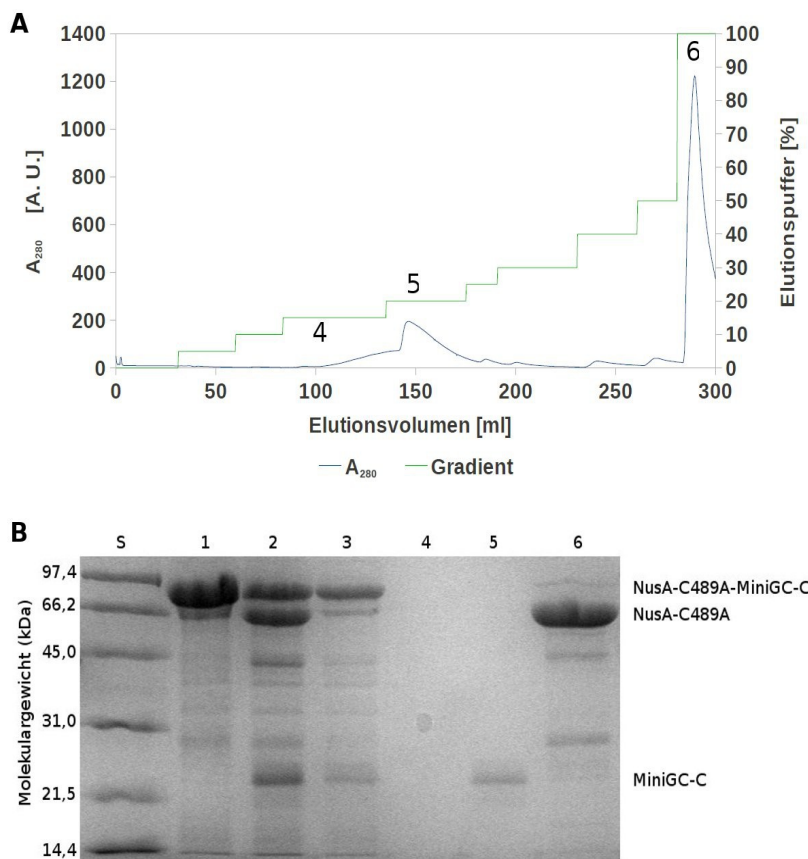
Abb. 4.29: Reinigung von NusA-C489A-MiniGC-C durch Nickelionen-Affinitätschromatographie. Der Elutionspuffer enthielt 20 mM Tris/HCl, pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 M Imidazol.

A) Chromatogramm. B) 15 % SDS-Polyacrylamidgel der Reinigung.

S: Molekulargewichtsstandard; 1: Pellet der Lyse; 2: Überstand der Lyse; 3: Säulendurchbruch; 4: Elution bei 25 mM Imidazol; 5 u. 6: Elution bei 100 mM Imidazol; 7: Elution bei 200 mM Imidazol.

Zwischen dem NusA-Anhang und MiniGC-C liegt eine PreScission-Schnittstelle, so dass der Löslichkeitsanhang durch PreScission proteolytisch entfernt werden kann. Nach etwa 15-stündiger Spaltung erscheint auf dem SDS-Gel eine Bande bei etwa 25 kDa, was gut mit dem rechnerischen Molekulargewicht von 22,7 kDa übereinstimmt (Abb. 4.30 B Bahn 2). Um die Protease anschließend aus dem Gemisch zu entfernen wurde dieses auf eine GST-Trap Säule aufgetragen. Der Säulendurchbruch, der nur noch wenig PreScission enthält (Abb. 4.30 B Bahn 3) wurde auf eine QXL-Anionenaustauschersäule aufgetragen um MiniGC-C von NusA und noch vorhandenem ungespaltenem Fusionsprotein zu trennen. Da der NusA-Anhang mit einem pI von 4,7 relativ sauer ist, bindet er wesentlich stärker an die Q-Sepharose als das nur schwach saure MiniGC-C (pI = 5,7)

und eluiert dementsprechend bei deutlich höheren Salzkonzentrationen. Abb. 4.30 zeigt Chromatogramm und SDS-Gel zur Analyse der Trennung. MiniGC-C eluiert ab etwa 75 mM NaCl von der Säule, während der NusA-Anhang erst bei Salzkonzentrationen von 500 mM und mehr eluiert. Die gelelektrophoretische Analyse zeigt, dass das gereinigte MiniGC-C hochrein ist (Abb. 4.30 B Bahn 5).



*Abb. 4.30: Isolierung von MiniGC-C durch Anionenaustauschchromatographie.*

*Der Elutionspuffer enthielt 20 mM TrisHCl, pH 8,0, 500 mM NaCl.*

*A) Chromatogramm. B) 19 % SDS-PAGE der PreScission-Spaltung und der chromatographischen Trennung.*

*S: Molekulargewichtsstandard; 1: Probe vor PreScission-Zugabe; 2: Probe nach PreScission-Zugabe; 3: Säulendurchbruch; 4: Elution bei 75 mM NaCl; 5: Elution bei 100 mM NaCl; 6: Elution bei 500 mM NaCl.*

#### 4.4.1.3 Größenausschlusschromatographie

Zur Kontrolle der Reinheit und zur Abschätzung des Molekulargewichts von MiniGC-C wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (siehe Kap. 3.35). Zur Kalibrierung der verwendeten Superdex 75 Säule wurden dabei die Proteine Ribonuclease A (MW = 13700 Da), Chymotrypsinogen (MW = 25000 Da) und Ovalbumin (MW = 44000 Da) gewählt und als Marker für das Totvolumen der Säule diente das polymere Saccharid Blue Dextran. Die Abschätzung beruht



auf der Annahme, dass alle verwendeten Referenzproteine und MiniGC-C eine annähernd gleiche, globuläre, äußere Form haben. Abb. 4.31 zeigt das Chromatogramm sowie die erstellte Eichgerade zur Größenabschätzung. Dass im Chromatogramm nur ein Elutionspeak erkennbar ist deutet darauf hin, dass das Protein relativ sauber gereinigt wurde und zumindest keine Verunreinigungen vorhanden sind, deren Molekulargewicht sich von MiniGC-C deutlich unterscheidet. Die aus dem Elutionsvolumen von MiniGC-C abgeleitete Masse beträgt 21,8 kDa und liegt damit relativ nahe am rechnerischen Wert von 22,8 kDa (Abweichung 4,4 %).

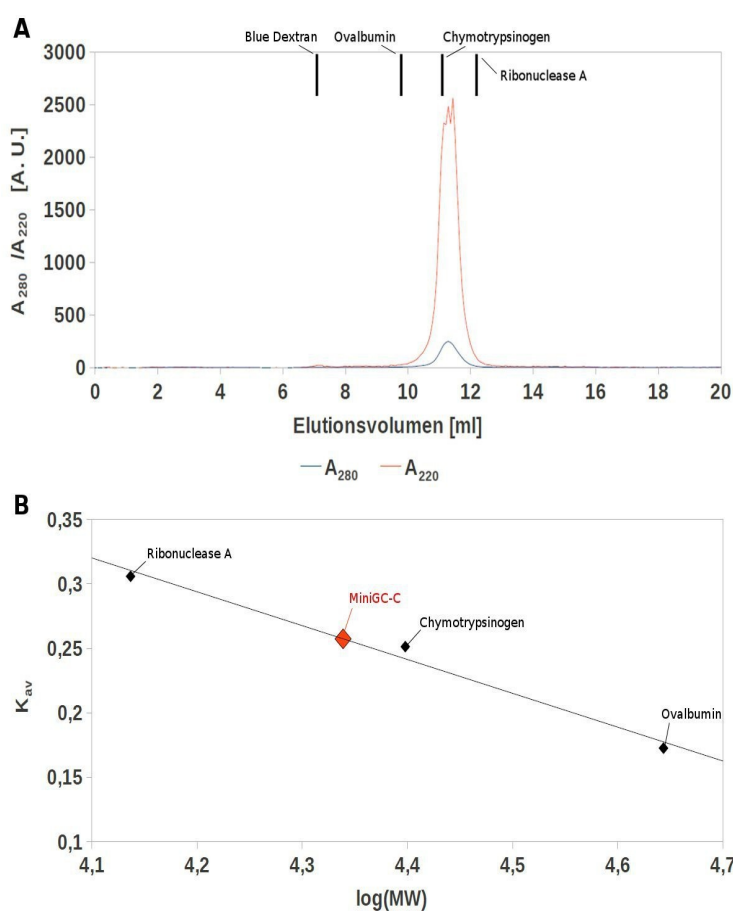


Abb. 4.31: Größenausschlusschromatographie von MiniGC-C. Verwendet wurde eine Superdex 75 Säule und als Puffer 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM NaCl. A) Chromatogramm. Die Elutionsvolumina von Blue Dextran und der Referenzproteine Ribonuclease A, Chymotrypsinogen und Ovalbumin sind gekennzeichnet. B) Eichgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts. Die Position von MiniGC-C auf der Geraden ist rot markiert. Durch lineare Regression wurde die Geradengleichung bestimmt:

$$K_{av} = -0,262 * \log(MW) + 1,396$$

Korrelationskoeffizient:

$$R^2 = 0,985$$

#### 4.4.1.4 CD-Spektroskopie mit MiniGC-C

Zur ersten strukturellen Charakterisierung des gereinigten MiniGC-C wurde CD-Spektroskopie verwendet (siehe Kap. 3.37). Das Fern-UV-CD-Spektrum von MiniGC-C deutet darauf hin, dass

das Protein eine deutlich ausgeprägte Sekundärstruktur hat (Abb. 4.32). Das Spektrum hat ein Maximum bei 195 nm und ein Minimum bei 208 nm, was für das Vorhandensein von  $\alpha$ -Helices spricht, jedoch fehlt das für einen hohen Helixanteil charakteristische Minimum bei 222 nm. Insgesamt spricht das Spektrum für eine Überlagerung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekundärstrukturanteilen. Die Analyse des Spektrums mit dem CDSSTR-Algorithmus (Johnson, 1999) ergab einen  $\alpha$ -Helixanteil von 13 % sowie einen Anteil an  $\beta$ -Strängen von 31 %. Diese Werte sind nicht in vollkommenem Einklang mit den aus der Aminosäuresequenz vorhergesagten Sekundärstrukturanteilen. Diese betragen 19 % für  $\alpha$ -Helices und 25 % für  $\beta$ -Stränge. Das auf der Kristallstruktur der ECD von GC-A basierende Strukturmodell von MiniGC-C enthält 25 %  $\alpha$ -Helix- und 24 %  $\beta$ -Faltblattanteil.

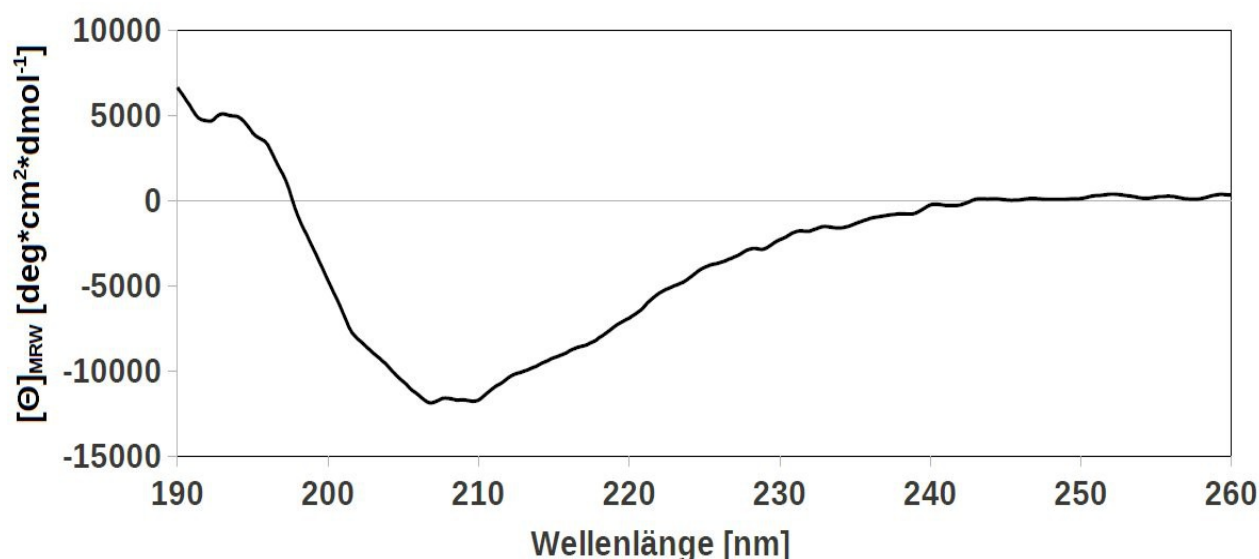


Abb. 4.32: Fern-UV-CD-Spektrum von MiniGC-C. Die Proteinkonzentration betrug 5  $\mu$ M, der verwendete Puffer war 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,0. Die Messung wurde bei 25 °C in einer 1 mm dicken Messküvette durchgeführt. Es wurden 15 Akkumulationen gemessen.

#### 4.4.1.5 NMR-Spektroskopie mit MiniGC-C

Mit dem hier vorgestellten Expressions- und Reinigungsprotokoll gelang die Herstellung ausreichender Mengen an  $^{15}\text{N}$ -markiertem MiniGC-C für NMR-Spektroskopie. Abb. 4.33 zeigt ein  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von MiniGC-C. Die große Dispersion der Rückgratamidssignale entlang der Protonendimension zeigt eindeutig, dass das Protein gefaltet ist.

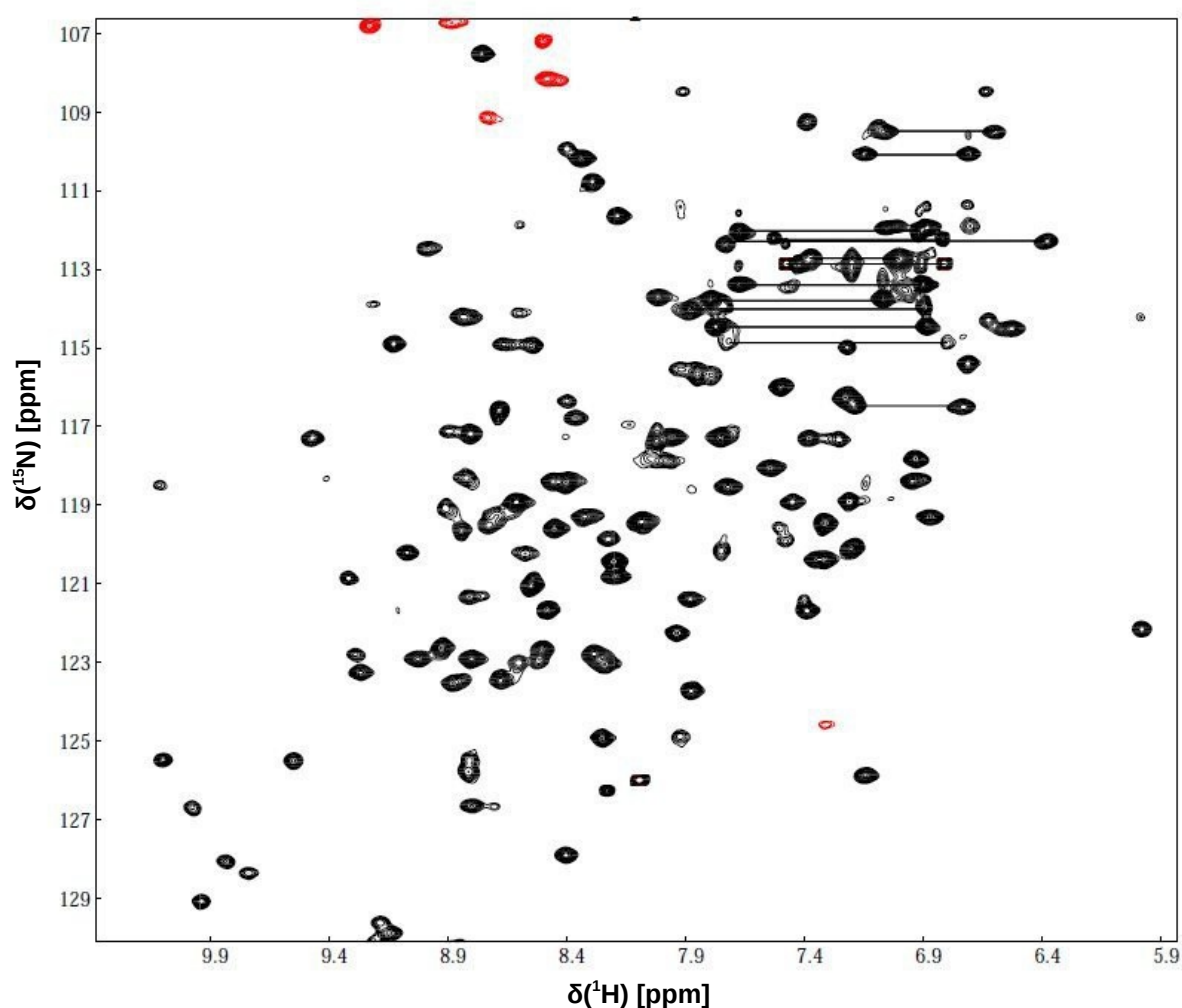


Abb. 4.33:  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -markiertem MiniGC-C. Signale der Seitenketten von Asparagin und Glutamin sind durch Linien gekennzeichnet. Die Probenkonzentration betrug  $330\ \mu\text{M}$ . Das Spektrum wurde bei  $25\ ^\circ\text{C}$  aufgenommen. Der verwendete Messpuffer war  $20\ \text{mM}$  Kaliumphosphat,  $\text{pH } 7,0$ ,  $100\ \text{mM}$   $\text{NaCl}$ ,  $10\ \%$   $\text{D}_2\text{O}$  (v/v),  $0,04\ \%$   $\text{NaN}_3$  (w/v). Spektral gefaltete Resonanzen sind rot markiert.

Es fällt jedoch auf, dass das Spektrum wesentlich weniger detektierbare Signale enthält als zu erwarten wären. Bei einer Größe von 197 Aminosäuren und 10 in der Sequenz enthaltenen Prolinen sollten maximal 186 Rückgratresonanzen zu beobachten sein. In Abb. 4.33 sind jedoch nur 121 Signale klar detektierbar, d. h. ein Drittel der zu erwartenden Signale sind so stark verbreitert, dass sie neben dem Signalrauschen nicht mehr identifiziert werden können. Das Fehlen so vieler Resonanzsignale deutet darauf hin, dass in einem Teil des Proteins dynamische Austauschprozesse vorliegen, welche auf einer Zeitskala ablaufen, die keine Detektion der betroffenen Signale im NMR-Spektrum erlaubt. Diese Annahme wird unterstützt durch die relativ großen

Intensitätsunterschiede bei den Signalen im Spektrum. Eine Reihe der zu beobachtenden Resonanzen haben deutlich geringere Intensitäten.

#### 4.4.1.6 Bindungsstudien mit Uroguanylin und STh

Um die Frage zu klären, ob MiniGC-C als Teil der extrazellulären Domäne von GC-C in der Lage ist, die natürlichen Liganden von GC-C zu binden, oder ob diese Eigenschaft in der isolierten Subdomäne verlorengegangen ist, wurden NMR-Titrationsen durchgeführt. Die Möglichkeit, sowohl MiniGC-C als auch die Liganden Uroguanylin und STh  $^{15}\text{N}$ -markiert zu exprimieren, erlaubt eine sehr genaue Charakterisierung einer möglichen Bindung, da ihre Auswirkungen an beiden Bindungspartnern beobachtet werden kann. So wurden zuerst NMR-Titrationsen von MiniGC-C und Uroguanylin durchgeführt, wobei in getrennten Experimenten sowohl MiniGC-C (Abb. 4.34 A) als auch Uroguanylin (Abb. 4.34 B) vorgelegt wurden.

Bei beiden Titrationsen sind keinerlei Veränderungen der chemischen Verschiebungen als Reaktion auf die Zugabe des Bindungspartners zu beobachten. Auch ein eventuelles Auftauchen neuer Signale oder eine starke Verbreiterung der bestehenden Resonanzen, wie es im Falle eines langsamen oder intermediären Austausch-Regimes zu erwarten wäre, kann nicht beobachtet werden. Zwar sind im HSQC-Spektrum von MiniGC-C, wie bereits erwähnt, nur ein Teil der zu erwartenden Signale beobachtbar, so dass denkbar wäre, dass sich die Bindungsregion auf den Teil des Proteins beschränkt, der im Spektrum nicht repräsentiert ist. Jedoch wäre eine solche Bindung in jedem Fall an den Resonanzsignalen von Uroguanylin (Abb. 4.34 B) detektierbar. Aus Abb. 4.34 geht damit eindeutig hervor, dass MiniGC-C nicht in der Lage ist, den endogenen GC-C-Agonisten Uroguanylin zu binden.

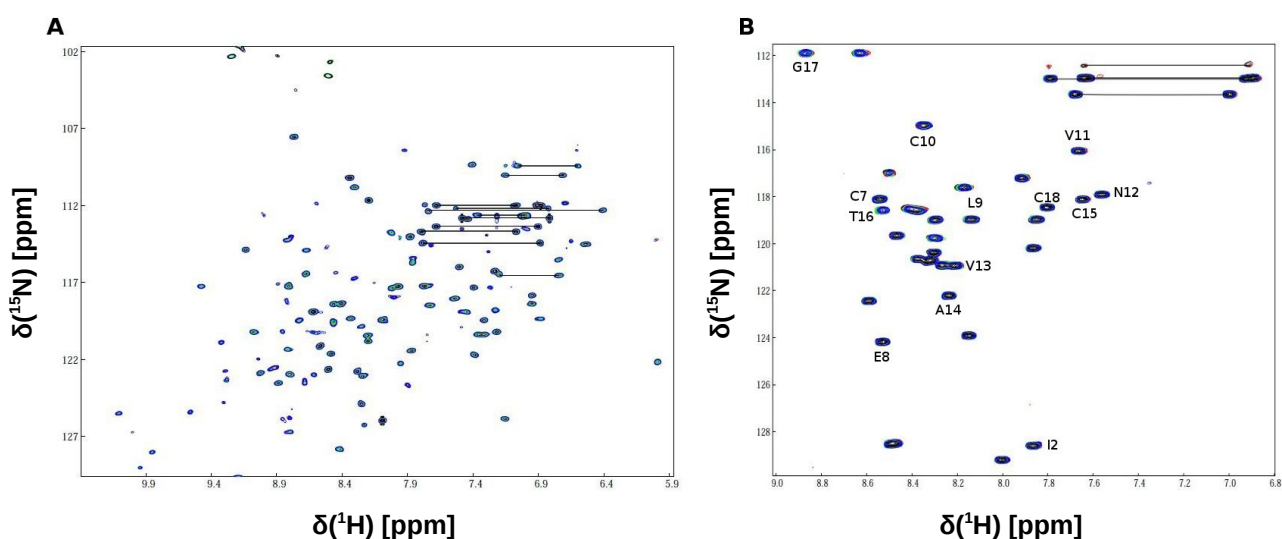


Abb. 4.34: NMR-Titrationsen der Partner MiniGC-C und Uroguanylin.  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren wurden bei 25 °C, als Puffer wurde 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  (v/v) und 0,04 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  verwendet. A) 50  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -markiertes MiniGC-C titriert mit unmarkiertem Uroguanylin. Basisspektrum (schwarz) und Zugabe von 0,5 (rot), 1 (grün) und 2 (blau) molaren Äquivalenten Uroguanylin. B) 40  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -markiertes Uroguanylin titriert mit unmarkiertem MiniGC-C. Die Uroguanylin-Probe enthält Anteile der bei der Reinigung auftretenden inaktiven Uroguanylin-Konformation. Basisspektrum (schwarz) und Zugabe von 1 (rot), 2 (grün) und 3 (blau) molaren Äquivalenten MiniGC-C.

Bei porzinem MiniGC-C wurde eine Bindung an das hitzestabile Enterotoxin STp gemessen und publiziert (Lauber *et al.*, 2009). Um das negative Ergebnis bei der Bindung von Uroguanylin zu überprüfen wurden die NMR-Titrationsen unter Verwendung von STh als Bindungspartner wiederholt. Die in Abb. 4.35 dargestellten Ergebnisse zeigen jedoch, dass auch STh nicht in der Lage ist, an MiniGC-C zu binden, da es im Verlauf der Titrationsen zu keinerlei beobachtbaren Änderungen der Signale in den jeweiligen HSQC-Spektren von MiniGC-C (Abb. 4.35 A) bzw. STh (Abb. 4.35 B) kommt.

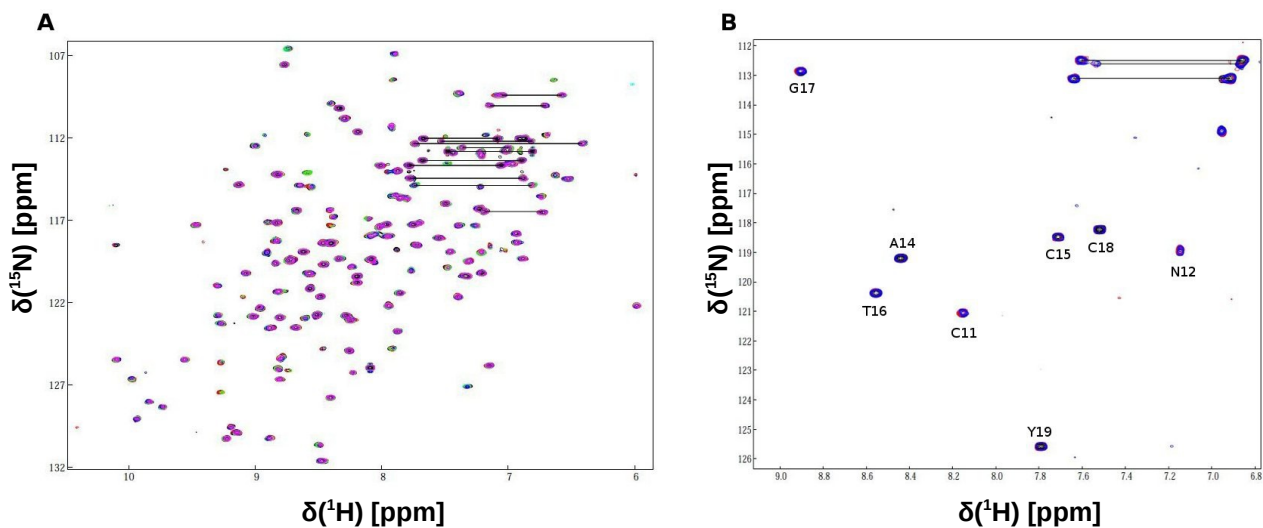


Abb. 4.35: NMR-Titrationsen der Partner MiniGC-C und STh. Es wurden  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von reinem  $^{15}\text{N}$ -markiertem MiniGC-C bzw. STh sowie der einzelnen Titrationsschritte aufgenommen. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt, als Puffer wurde 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 %  $\text{D}_2\text{O}$  (v/v) und 0,04 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  verwendet. A) Titration von 50  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -MiniGC-C mit unmarkiertem STh. Basisspektrum (schwarz) und Zugabe von 0,5 (rot), 1 (grün), 2 (blau) und 4 (magenta) molaren Äquivalenten STh. B) 26  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -markiertes STh titriert mit unmarkiertem MiniGC-C. Basisspektrum (schwarz) und Zugabe von 0,5 (rot) und 2 (blau) molaren Äquivalenten MiniGC-C

#### 4.4.2 Expression der gesamten extrazellulären Domäne von GC-C (ECD-GC-C) in *E. coli*

Da durch die Verkürzung der extrazellulären Domäne von GC-C offensichtlich deren Fähigkeit zur Ligandenbindung verlorenght, wurde in einem nächsten Schritt versucht, die gesamte ECD zu exprimieren. Als Expressionswirt wurde zunächst wieder *E. coli* gewählt, da ein bakterielles Expressionssystem meist größere Mengen an heterologem Protein liefert als eukaryotische Alternativen. Außerdem bietet *E. coli* die Möglichkeit, die exprimeierten Proteine einfach und kostengünstig mit NMR-aktiven Nukliden zu markieren. Dies ist bei eukaryotischen Expressionssystemen oft schwierig, da für die Anzucht und Expression zumeist komplexe Nährmedien benötigt werden.

Jedoch sind die Anforderungen bei der Expression der ECD von GC-C in *E. coli* beträchtlich. Mit 407 Aminosäuren ist das Protein relativ groß. Außerdem enthält es 4 intramolekulare

Disulfidbrücken und 9 N-Glykosylierungsstellen. Dementsprechend ist aus humanen Zellen extrahiertes GC-C stark glykosyliert (Schulz *et al.*, 1990) und es ist nicht völlig klar inwieweit die Glykosylierung des Proteins zur korrekten Faltung beiträgt (Hasegawa *et al.*, 1999b).

Auf ihre Eignung zur Expression der ECD wurden zunächst zwei verschiedene Konstrukte untersucht, pET32a-ECD-GC-C und pET43.1a-NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C. Sie kodieren für die Fusionsproteine Trx-ECD-GC-C und NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C. Trx-ECD-GC-C enthält einen Thioredoxin-Löslichkeitsanhang sowie einen Hexahistidin-Reinigungsanhang, die beide durch PreScission-Protease von GC-C abspaltbar sind. NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C enthält einen Hexahistidin-Anhang und den von der Reinigung von MiniGC-C bekannten NusA-Löslichkeitsanhang. Dieser wurde so modifiziert, dass alle drei in NusA enthaltenen Cysteine, Cys-251, Cys-454 und Cys-489 durch Alanine ersetzt wurden. Zur Freisetzung der ECD dient wiederum PreScission-Protease.

#### **4.4.2.1 Expression von Trx-ECD-GC-C und NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C in *E. coli***

Aufgrund der in der ECD von GC-C enthaltenen vier Disulfidbrücken erfolgte die Expression der Proteine in *E. coli* Origami B (DE3). Beide Konstrukte wurden per Elektroporation in die elektrokompenten Zellen eingebracht und in LB-Medium angezogen (siehe Kap. 3.25). Die Expression erfolgte bei 20 °C über Nacht und wurde im Fall von Trx-ECD-GC-C mit 0,1 mM IPTG und im Fall von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C mit 1 mM IPTG induziert. Abb. 4.36 zeigt die Analyse der beiden Zellanzuchten per SDS-Gelelektrophorese.

Trx-ECD-GC-C wird stark exprimiert, was an der deutlichen Bande, die nach 18 Stunden bei etwa 50 kDa zu sehen ist, erkennbar wird. Im Gegensatz dazu ist die Expression von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C deutlich schwächer. Bei 100 kDa ist eine Bande erkennbar, die NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C entspricht. Da diese Bande aber auch schon vor der Induktion sichtbar ist, muss von einer unzureichenden Kontrolle der Expression durch den Promotor ausgegangen werden. Bei beiden Anzuchten wurden die Zellen nach 18 h geerntet.

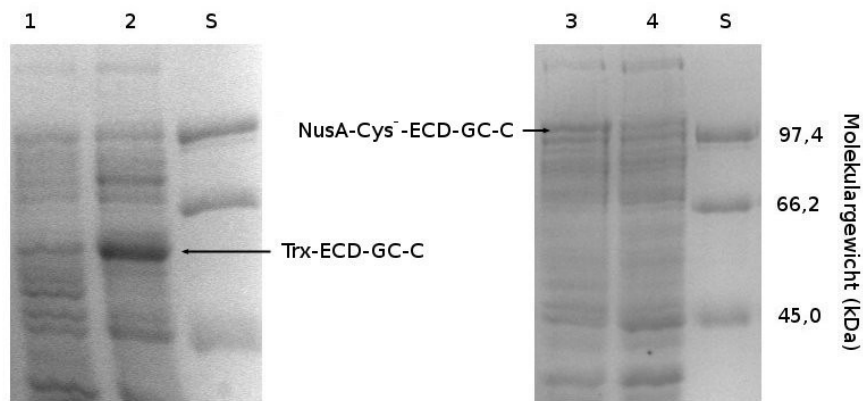


Abb. 4.36: Induktion der Expression von TRX-ECD-GC-C (Bahnen 1 und 2) und NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C (Bahnen 3 und 4). Zellproben wurden vor der Induktion und jeweils 18 h nach Beginn der Induktion auf 10 % SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. S: low range Molekulargewichtsstandard; Expression von TRX-ECD-GC-C: 1: vor Induktion; 2: 18 h nach Induktion; Expression von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C: 1: vor Induktion; 2: 18 h nach Induktion.

#### 4.4.2.2 Reinigung von Trx-ECD-GC-C und NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C

Die geernteten Zellen wurden zunächst aufgeschlossen und es wurde geprüft, ob sich das Protein im löslichen Überstand oder im unlöslichen Pellet befand. Trx-ECD-GC-C war vollständig unlöslich und nur im Pellet nachweisbar (Abb. 4.37 B, Bahn 1). Das Fusionsprotein wurde deswegen mit 8 M Harnstoff aus dem Pellet extrahiert. Selbst die hohe Harnstoffkonzentration konnte nur einen Teil des vorhanden Proteins solubilisieren, was aus dem Vergleich von Proben aus Pellet und Überstand der Harnstoffextraktion hervorgeht (Abb. 4.37 B, Bahnen 3 und 4). Es wurde versucht, Trx-ECD-GC-C durch Verdünnung des Harnstoffs auf eine Endkonzentration von 2 M zurückzufalten, was dazu führte, dass ein großer Teil des solubilisierten Proteins wieder präzipitierte (Abb. 4.37 B, Bahnen 5 und 6). Letztendlich konnte nur ein relativ kleiner Teil des exprimierten Fusionsproteins in Lösung gehalten werden. Dieser Teil wurde durch Nickelionen-Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 4.37 A), was zu einer insgesamt großen Reinheit des Proteins führte (Abb. 4.37 B, Bahn 10). Jedoch ging dieses Protein binnen weniger Stunden nach dem Chromatographie-Schritt durch Präzipitation fast vollständig verloren. Insgesamt wurde aus dem Reinigungsversuch geschlossen, dass pET32a-ECD-GC-C aufgrund der fehlenden Löslichkeit kein geeignetes System zur Expression der ECD ist.

NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C wurde zwar weniger stark exprimiert, war jedoch wesentlich besser löslich



als Trx-ECD-GC-C. Vorversuche ergaben, dass die Zugabe von 0,05 % des nichtionischen Detergenz Brij-35 die Löslichkeit von NusA-ECD-GC-C deutlich verbessert (Weirich, 2009). Außerdem konnte die Menge an gelöstem Fusionsprotein erhöht werden, wenn das unlösliche Pellet des Zellaufschlusses am Microfluidizer erneut in Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung weiter solubilisiert wurde (Abb. 4.37 D, Bahnen 13 und 14).

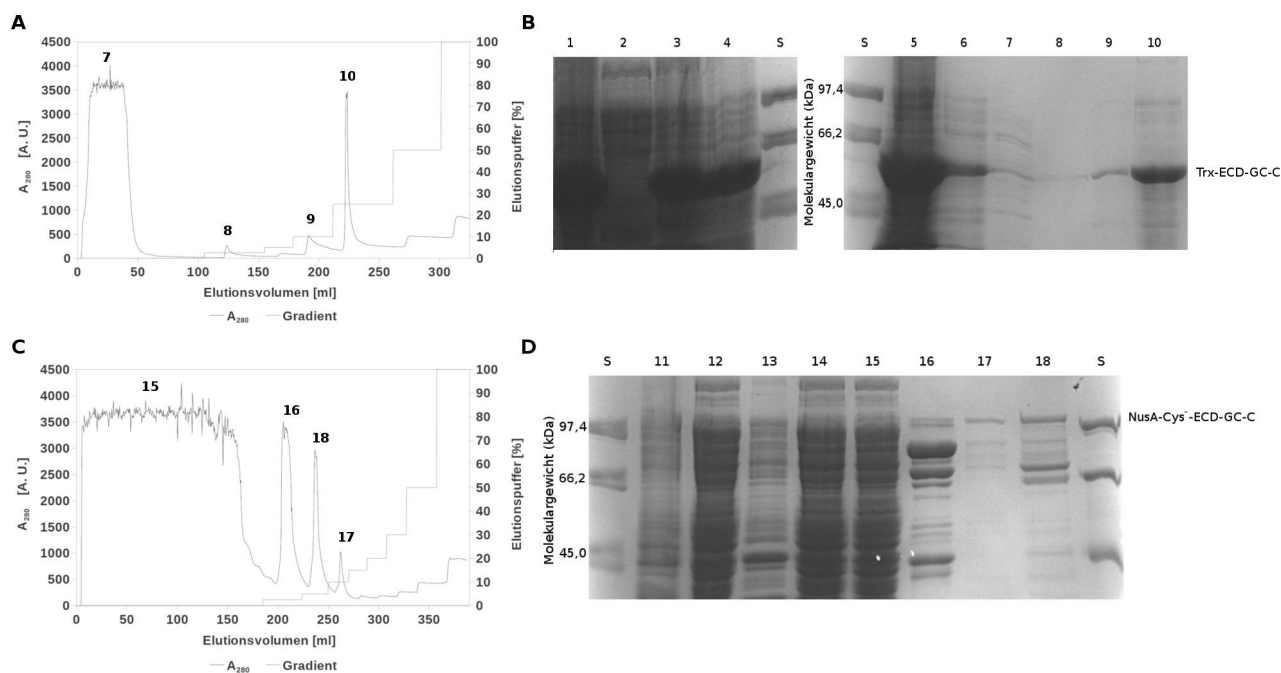


Abb. 4.37: Reinigung von TRX-ECD-GC-C und NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C durch Nickelaffinitäts-Chromatographie. A) Chromatogramm und B) 10 % SDS-Acrylamidgel der Reinigung von TRX-ECD-GC-C; C) Chromatogramm und D) 10 % SDS-Acrylamid-Reinigungsgel von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C. SDS-Gel von TRX-ECD-GC-C: 1: Pellet Zellaufschluss; 2: Überstand Zellaufschluss; 3: Pellet 8 M Harnstoffextraktion; 4: Überstand 8 M Harnstoffextraktion; 5: Pellet Rückfaltung; 6: Überstand Rückfaltung; 7: Durchbruch der Nickel-Säule; 8: Elution bei 25 mM Imidazol; 9: Elution bei 100 mM Imidazol; 10: Elution bei 200 mM Imidazol. SDS-Gel von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C: 11: Pellet Lyse am Microfluidizer; 12: Überstand Lyse am Microfluidizer; 13: Pellet Lyse per Ultraschall; 14: Überstand Lyse per Ultraschall; 15: Durchbruch der Nickelsäule; 16: Elution bei 25 mM Imidazol; 17: Elution bei 100 mM Imidazol; 18: Elution bei 50 mM Imidazol. S: low range Proteinstandard.

Die vereinigten Überstände wurden auf eine Hitrap Nickelionen-Affinitätschromatographiesäule aufgetragen. Das Fusionsprotein eluierte ab Imidazolkonzentrationen von 50 mM und wurde

gesammelt (Abb. 4.37 C). Die gelelektrophoretische Analyse zeigt jedoch, dass die Fraktionen noch verunreinigt waren, insbesondere sind zwei starke Banden bei etwa 66 kDa und 75 kDa zu erkennen (Abb. 4.37 D, Bahn 18).

Im nächsten Schritt wurde versucht, das Fusionsprotein durch Behandlung mit PreScission-Protease zu spalten um den Löslichkeits- und Reinigungsanhang zu entfernen. Abb. 4.38 A zeigt, dass die Proteasebehandlung nicht, oder nur in sehr geringem Ausmaß, zu einer Spaltung des Fusionsproteins führt. Die Bande bei 100 kDa repräsentiert NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C, was durch einen Peptidmassenfingerabdruck bestätigt wurde. Sie verliert durch die Anwesenheit der Protease nicht erkennbar an Intensität (Abb. 4.38 A, Bahn 3).

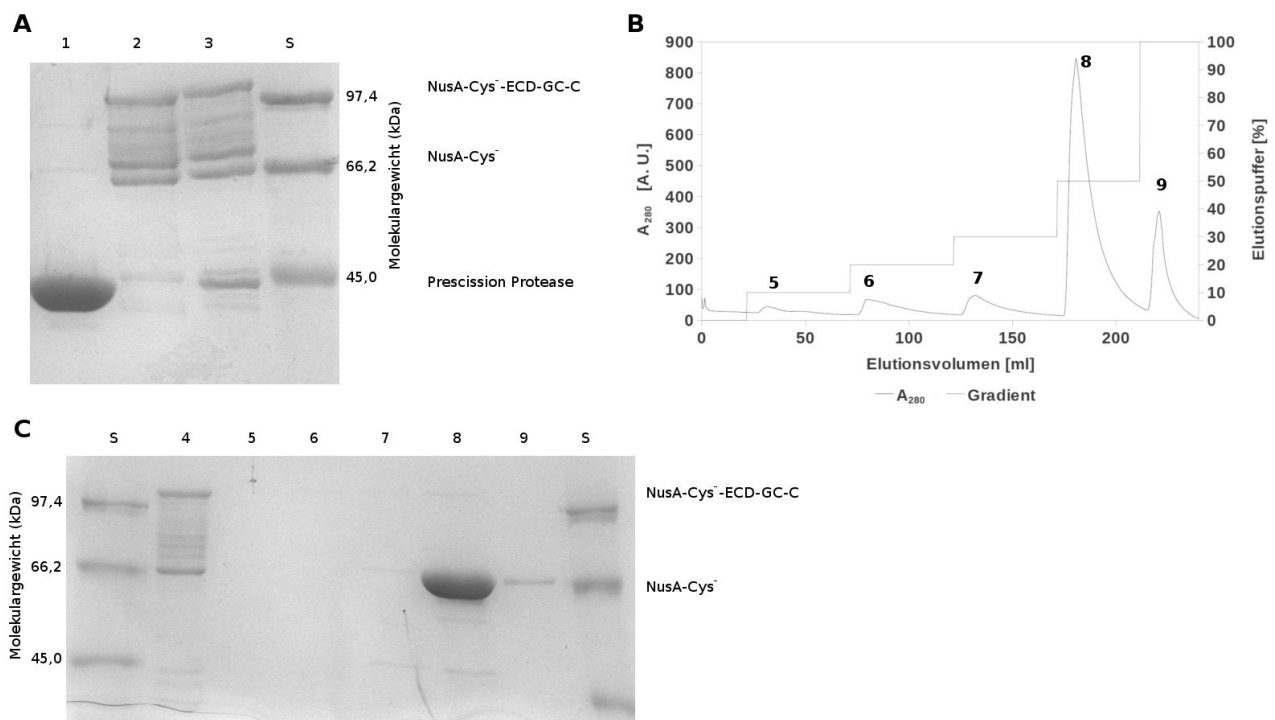


Abb. 4.38: PreScission-Spaltung und Anionenaustauschchromatographie von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C. A) 10 % SDS-Acrylamidgel der versuchten PreScission-Spaltung. B) Chromatographische Auftrennung des PreScission-Spaltansatzes durch eine HiTrap<sup>TM</sup> QXL Säule und C) 10 % SDS-Acrylamid-Reinigungsgel. S: low range Proteinstandard. 1: PreScission-Protease; 2: Protein-Probe vor der Spaltung; 3: Protein-Probe 20 h nach Zugabe von PreScission; 4: Säulendurchbruch; 5: Elution bei 100 mM NaCl; 6: Elution bei 200 mM NaCl; 7: Elution bei 300 mM NaCl; 8: Elution bei 500 mM NaCl; 9: Elution bei 1 M NaCl.

Eine Bande für die ECD, die rechnerisch bei etwa 46 kDa liegen sollte, kann nicht beobachtet werden, wird aber möglicherweise von der PreScission-Protease überdeckt. Der Spaltansatz wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie an einer HiTrap™ QXL-Säule aufgetrennt. Dabei zeigt sich, dass nur ein Protein stark an die Säule bindet, welches bei hohen Salzkonzentrationen ab etwa 500 mM eluiert und auf dem SDS-Polyacrylamidgel bei etwa 66 kDa läuft. Bei dem Protein handelt es sich sehr wahrscheinlich um den NusA-Anhang. Ob dieser durch die PreScission-Behandlung abgespalten wurde oder bereits vorher durch proteolytischen Abbau von GC-C aus dem Fusionsprotein entsteht, konnte nicht ermittelt werden.

Insgesamt konnte die ECD von GC-C nicht an die QXL-Säule gebunden werden. Interessant ist, dass das Fusionsprotein NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C ebenfalls nicht an die Säule bindet und im Durchbruch zu finden ist, obwohl der relativ niedrige rechnerische pI von 4,79 dies erwarten ließe (Abb. 4.38 C, Bahn 4).

Da eine weitere Aufreinigung des Fusionsproteins nicht gelang, wurde der Durchbruch der Anionenaustauschchromatographie konzentriert und zur weiteren Charakterisierung verwendet.

#### 4.4.2.3 Größenausschluss-Chromatographie

Das sonderbare Laufverhalten von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C an Ionenaustauscher-Säulen (Abb. 4.38) gab Anlass zu einer genaueren Untersuchung seines Oligomerisierungsgrads. Dies wurde durch Größenausschlusschromatographie an zwei nacheinandergeschalteten Superdex™ 200 10/300 GL Säulen erreicht (Abb. 4.39). Als Marker für das Totvolumen der Säule wurde dabei das hochmolekulare Polysaccharid Blue Dextran verwendet. Es zeigte sich, dass der Großteil des Proteins aus der Probe mit dem Totvolumen der Säule, annähernd gleichzeitig wie Blue Dextran, eluiert. Auch die gelektrophoretische Analyse zeigt, dass es sich bei dem im Totvolumen der Säule eluierenden Protein um NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C handelt (Abb. 4.39 B, Bahnen 1 und 2). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Fusionsprotein größere Oligomere bildet, deren Assoziationsgrad deutlich über das für die ECD diskutierte Dimerisierungsverhalten hinausgeht (Hirayama *et al.*, 1993).

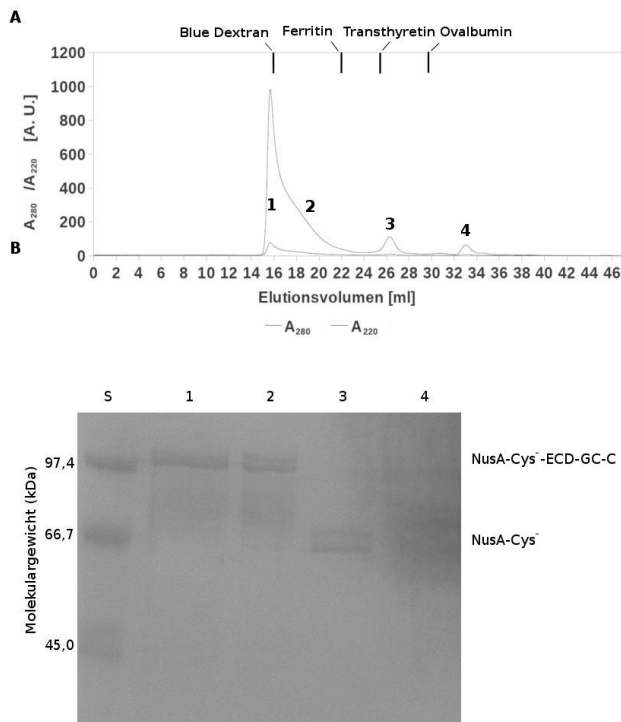


Abb. 4.39: Größenausschluss-Chromatographie von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C an zwei Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL Säulen.

A) Chromatogramm von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C. Die Elutions-volumina von Blue Dextran (Säulen-Totvolumen), Ferritin (MW = 440 kDa), Transthyretin (MW = 63,5 kDa) und Ovalbumin (MW = 44 kDa) sind durch senkrechte Linien gekennzeichnet. B) 10 % SDS-Polyacrylamidgel mit Proben, die bei den Elutionsvolumina 1: 16 ml; 2: 19,5 ml; 3: 26,5 ml und 4: 33 ml entnommen wurden. S: low range Proteinstandard.

Angeichts der schon angesprochenen Schwierigkeiten, das humane Protein GC-C in *E. coli* zu exprimieren, besteht die Möglichkeit, dass die beobachtete Oligomerisierung einfach durch eine fehlerhafte Faltung des Proteins im bakteriellen Wirt und eine intermolekulare Disulfidverbrückung erklärt werden kann. Diese Annahme konnte durch ein einfaches gelelektrophoretisches Experiment bestätigt werden (Abb. 4.40).

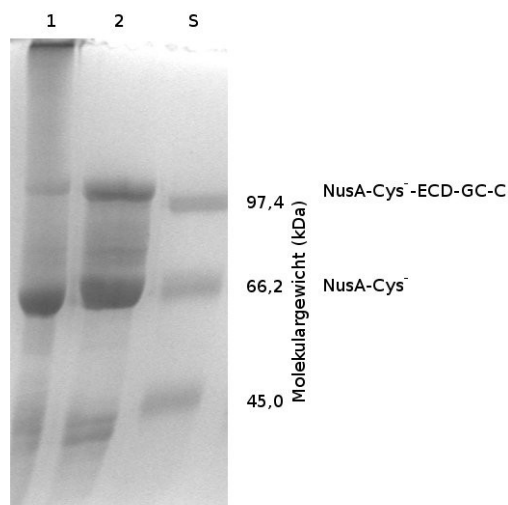


Abb. 4.40: Nachweis intermolekularer Disulfidverbrückung durch SDS-PAGE. 1: Probe mit 20 % Glycerin, 1 % SDS als Beladungspuffer (enthält kein  $\beta$ -Mercapto-ethanol; nicht reduzierend); 2: Probe mit Roti®-Load 1 als Beladungspuffer (reduzierend); S: low range Proteinstandard.

Der für die SDS-PAGE in dieser Arbeit standardmäßig verwendete Probenpuffer Roti®-Load 1 enthält u. a. auch ein thiolhaltiges Reduktionsmittel, welches die intermolekularen Disulfidbindungen vor der Gelelektrophorese reduziert (Abb. 4.40, Bahn 2). Ersätzt man Roti®-Load 1 durch eine Lösung von 20 % Glycerin und 1 % SDS, also einen nicht-reduzierenden Beladungspuffer, so führt dies dazu, dass NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C nicht in das Polyacrylamidgel eindringen kann und als Bande an der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel bleibt (Abb. 4.40, Bahn 1). Die Bande bei etwa 100 kDa ist als Konsequenz deutlich schwächer. Aus diesem Ergebnis folgt, dass die Oligomerisierung von NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C tatsächlich auf die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken zurückzuführen ist.

#### 4.4.2.4 NMR-Titration von Uroguanylin mit NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C

Zuletzt wurde eine mögliche Bindung des exprimierten NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C an die Liganden von GC-C untersucht. Abb. 4.41 zeigt die Titration von <sup>15</sup>N-markiertem Uroguanylin mit dem gereinigten Fusionsprotein. Ähnlich wie bei MiniGC-C kann auch bei der hier exprimierten extrazellulären Domäne von GC-C keine Bindung an Uroguanylin festgestellt werden. Es sind keine Veränderungen des NMR-Spektrums von Uroguanylin durch die Zugabe des Fusionsproteins zu beobachten. Damit zeigt sich, dass die Expression der ECD von GC-C in *E. coli* nicht zur Gewinnung von aktiven Proteinen führt. Sämtliche Reinigungsversuche führten entweder zu unlöslichem Protein, wie im Fall von Trx-ECD-GC-C, oder, wie bei NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C, zu oligomerisierten Spezies, die vermutlich auf eine Fehlfaltung des Proteins zurückgehen.

Zusätzlich zu den hier gezeigten Ergebnissen wurden im Rahmen von Bachelor- und Masterarbeiten eine Reihe weiterer Konstrukte für die Expression der ECD in *E. coli* untersucht, jedoch konnte in keinem Fall eine erfolgreiche Reinigung der funktionalen Rezeptordomäne erreicht werden (Kap. 5.6).

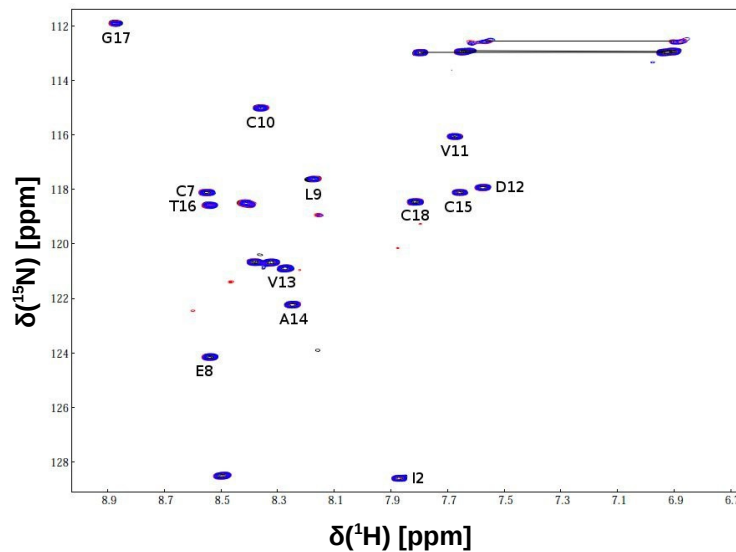


Abb. 4.41: NMR-Titrationsen von Uroguanylin mit NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C. [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-HSQC-Spektren von <sup>15</sup>N-markiertem Uroguanylin wurden bei 25 °C aufgenommen, als Puffer wurde 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 % D<sub>2</sub>O (v/v) und 0,04 % (w/v) NaN<sub>3</sub> verwendet. B) 20 μM <sup>15</sup>N-markiertes Uroguanylin titriert mit der unmarkierten NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C-Probe. Die Gesamtproteinkonzentration der Probe betrug 55 mg/ml, sie war jedoch verunreinigt (Abb. 33, Bahn 2). Basisspektrum von <sup>15</sup>N-markiertem Uroguanylin (schwarz) und Zugabe von 80 μl (rot) und 150 μl (blau) der NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C-Probe.

#### 4.4.3 Expression der extrazellulären Domäne von GC-C in *Pichia pastoris*

Die bei der Expression in *E. coli* beobachtete Fehlfaltung der extrazellulären Domäne von GC-C kann möglicherweise auf das Fehlen einer geeigneten Faltungsmaschinerie zurückgeführt werden, die sowohl Chaperone als Faltungshelfer, als auch die unterstützende Wirkung des eukaryotischen Sekretionssystems, evtl. in Verbindung mit post-translationalen Modifikationen, einschließt.

GC-C ist ein Glykoprotein mit insgesamt neun Erkennungssequenzen für N-Glykosylierungen und es ist anzunehmen, dass die Glykosylierung der ECD einen Einfluss auf deren Faltung ausübt, was auch in der Literatur diskutiert wird (Hasegawa *et al.*, 1999b; Ghanekar *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Überlegungen wurde versucht die ECD von GC-C in einem eukaryotischen Wirtssystem zu exprimieren. Die Wahl fiel auf die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris*, da diese sich durch eine Reihe von Vorteilen gegenüber alternativen eukaryotischen Expressionssystemen auszeichnet:

- aufgrund der phylogenetischen Nähe zum genetisch gut verstandenen Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae* gestaltet sich die genetische Manipulation von *P. pastoris* relativ einfach. Das Einbringen von Fremdgenen erfolgt durch spezifische Expressionsvektoren, die dann durch homologe Rekombination ins Wirtsgenom stabil integriert werden.
- *P. pastoris* kann auf relativ kostengünstigen Wachstumsmedien zu hohen Zelldichten (> 200 mg/ml Nasszellgewicht) angezogen werden. Außerdem existieren Promotoren, die eine enge Regulation der Genexpression und die Produktion großer Mengen an rekombinantem Fremdprotein erlauben.
- *P. pastoris* wird in Minimalmedien kultiviert, was eine einfache Markierung der rekombinanten Proteine mit NMR-aktiven Isotopen ermöglicht. Als Stickstoffquelle können z. B. Ammoniumsulfat oder Ammoniak verwendet werden, als Kohlenstoffquelle dienen u. a. Glycerol oder Methanol. Außerdem kann *P. pastoris*, im Gegensatz zu vielen anderen eukaryotischen Expressionssystemen wie Insekten- oder Säugerzellen, gut in D<sub>2</sub>O wachsen (Morgan *et al.*, 2000). Insbesondere bei der Untersuchung größerer Proteine mit NMR-Methoden ist die Deuterierung des untersuchten Proteins ein wichtiges Hilfsmittel zur Verbesserung der Relaxationseigenschaften.
- Wie alle eukaryotischen Expressionssysteme kann *P. pastoris* exprimierte Proteine post-translational modifizieren. Außerdem verfügt es über Sekretionssysteme, die denen von humanen Zellen ähnlich sind, so dass die heterologe Expression der ECD von GC-C unter Bedingungen erfolgt, die der natürlichen Genexpression wesentlich ähnlicher sind als dies in bakteriellen Wirtsorganismen der Fall ist.

#### **4.4.3.1 Klonierung von pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis und Identifizierung von geeigneten Expressionsklonen**

Als Expressionsvektor wurde pPIC9K gewählt (Abb. 4.42 A). In diesem Vektor ist die Expression eines Fremdgens unter die Kontrolle des Promotors für die Alkohol-Oxidase 1 (AOX1) gestellt. Bei AOX1 handelt es sich um ein Protein, dessen Expression äußerst präzise reguliert ist, und das nur in Gegenwart von Methanol induziert wird, wobei dann aber eine starke Expression erfolgt, so dass in Zellen, die auf Methanol wachsen, typischerweise bis zu 30 % des löslichen Gesamtproteins auf

AOX1 entfallen (Invitrogen, 2009).

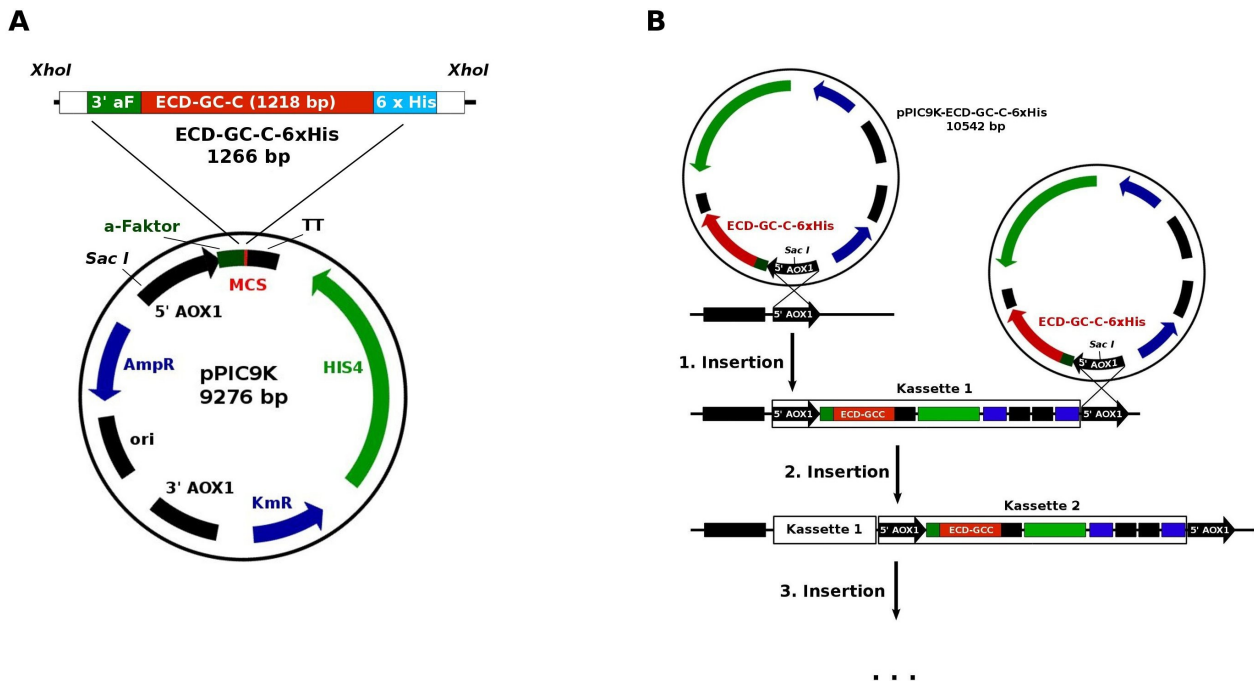


Abb. 4.42: Multi-Kopien-Integration und sekretierte Expression von ECD-GC-C durch das Konstrukt pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis. A) Das Gen für ECD-GC-C wurde, inklusive eines kodierten Hexahistidin-Anhangs am 3'-Ende, durch das Restriktionsenzym XhoI in die Multiple Klonierungsstelle von pPIC9K inseriert. B) Schematische Darstellung der Multi-Kopien-Insertion von pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis in das Chromosom von *P. pastoris*. Dadurch entstehen mehrere sog. Expressionskassetten, die alle jeweils die Gene für ECD-GC-C-6xHis sowie die Geneticin-Resistenz enthalten. Bevor das Konstrukt durch Rekombination in das Hefe-Genom eingeführt werden kann muss es durch einen Restriktionsschnitt, z. B. SacI, linearisiert werden. MCS: Multiple Klonierungsstelle; TT: Transkriptions-Terminator; HIS4: Gen für Histidinol Dehydrogenase; KmR: Geneticin-Resistenz; AmpR: bakterielle Ampicillin-Resistenz; ori: bakterieller Replikationsursprung; 5' AOX1: Promotor für Alkohol Oxidase 1; 3' AOX1: 3' Fragment von Alkohol Oxidase 1; a-Faktor: Sekretionssignal des  $\alpha$ -mating factors aus *S. cerevisiae*.

pPIC9K eignet sich für die sekretierte Expression eines Fremdgens, da der Vektor ebenfalls das Sekretionssignal des  $\alpha$ -Faktors aus *S. cerevisiae* kodiert. Das Gen von ECD-GC-C wurde, inklusive eines C-terminalen Hexahistidin-Anhangs (6xHis), unter Verwendung der Primer #13 und #14



sowie von *XhoI* als Restriktionsenzym in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) von pPIC9K eingebracht. Vorher wurde durch eine stille ortsgerichtete Mutagenese eine weitere *XhoI* Schnittstelle innerhalb des *HIS4* Gens von pPIC9K entfernt (siehe Kap. 3.15.5). Die *XhoI* Schnittstelle liegt am 3'-Ende des  $\alpha$ -Faktor Sekretionssignals, und es hat sich gezeigt, dass die Wahl der Integrationsstelle eines Fremdgens im Vektor erheblichen Einfluss auf dessen Expressionsrate hat. Bei Equistatin führt die Integration an der *XhoI* Schnittstelle zu einer gegenüber den nachfolgenden Restriktionsstellen der MCS erhöhten Proteinexpression was auf ein mögliches negatives Translationsregulationselement innerhalb der MCS zurückgeführt wurde (Outchkourov *et al.*, 2002).

Das Konstrukt pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis (siehe Kap. 10.1.10) wird, nach einer vorangehenden Linearisierung mit *SacI* und der Einbringung in die Hefezellen, durch homologe Rekombination stabil ins Wirtsgenom integriert. In etwa 1 – 10 % der Klone kommt es dabei zu einer sog. Mehrfachintegration, also der Integration mehrerer Kopien des Konstrukts, in das Wirtsgenom (Abb. 4.42 B). Die Plasmidkopien liegen dann als sog. Expressionskassetten im Genom vor, was aufgrund des Gen-Dosis-Effekts die Expressionsrate des Fremdgens erhöhen kann.

Das Plasmid pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis wurde durch Elektroporation in den Stamm *P. pastoris* GS115 eingebracht (siehe Kap. 3.12). Da dieser Histidin-auxotroph ist und pPIC9K durch das kodierte *HIS4*-Gen diese Auxotrophie kompensiert, können positive Klone durch Selektion auf Glukose-Minimalmediumagar-Platten identifiziert werden. Anschließend wurde versucht, Klone, in denen die oben beschriebene Mehrfachintegration des Konstrukts stattgefunden hat, zu identifizieren. Da pPIC9K ein Resistenzgen für das eukaryotische Antibiotikum Geneticin (KmR; das Gen ist identisch mit dem bakteriellen Kanamycin-Resistenzgen) besitzt, können durch die Selektion auf Nähragar-Platten mit steigenden Geneticin-Konzentrationen Klone isoliert werden, die mehrere Kopien des Konstrukts enthalten. Deswegen wurden die auf dem Minimalmedium selektierten positiven Klone erneut resuspendiert und auf Agarplatten ausplattiert, die YPD-Vollmedium und Geneticin in den Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,75 mg/ml und 3 mg/ml enthielten (siehe Kap. 3.30). Während auf den Platten mit 0,5 mg/ml Geneticin ein dichter Zellrasen zu beobachten war, konnten auf den Platten mit 1 mg/ml, 1,75 mg/ml und 3 mg/ml Geneticin jeweils etwa 450, 67 und 4 Kolonien gezählt werden. Die 4 Klone, die auf der höchsten Geneticin-Konzentration wuchsen, wurden gepickt und nochmals auf eine Agarplatte mit 3 mg/ml Geneticin ausgestrichen um falsch-positive Klone zu erkennen. Von den 4 ausgestrichenen Klonen wuchsen drei auch auf der neuen Platte.

Da in seltenen Fällen die Integration der Expressionsvektoren die Fähigkeit der Zellen zur

Expression von AOX1 und damit ihr Wachstum auf Methanol beeinträchtigt, wurden die drei identifizierten Multi-Kopien-Klone anschließend noch auf einer Agarplatte, die Minimalmedium mit Methanol als einziger Kohlenstoffquelle enthält, ausplattiert (siehe Kap. 3.31). Alle drei Klone konnten normal auf Methanol wachsen, so dass in einem weiteren Schritt durch Expressionstests die Fähigkeit der Klone zur Expression der ECD von GC-C überprüft wurde.

#### 4.4.3.2 Expressionstest

Für den Expressionstest der drei identifizierten Klone wurde mit diesen jeweils 25 ml glycerolhaltiges BMGY-Medium (siehe Kap. 3.4.2) angeimpft. Als Negativkontrolle wurde ein GS115 Klon verwendet, der mit pPIC9K transformiert wurde. Da die Expressionsplasmide stabil ins Hefegenom integriert sind, konnte darauf verzichtet werden, den Flüssigkulturen weiterhin Geneticin als Selektionsmittel zuzusetzen. Stattdessen wurde den Flüssigkulturen 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt um bakteriellen Kontaminationen entgegenzuwirken. Die Flüssigkulturen wurden bei 30 °C, der optimalen Wachstumstemperatur von *P. pastoris*, geschüttelt. Nach etwa 24 h erreichten die Kulturen OD<sub>600</sub>-Werte von etwa 6 - 7 und wurden abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in jeweils 100 ml methanolhaltigem BMMY-Medium (siehe Kap. 3.4.2) resuspendiert und weiter bei 30 °C und 250 rpm für eine Dauer von insgesamt 3 Tagen geschüttelt. Mit diesem Schritt begann die Induktion der Proteinexpression. Das BMMY-Medium enthielt 0,5 % Methanol und alle 24 h wurde jeweils 0,4 ml Methanol zugegeben. Außerdem wurden an jedem Tag der Testexpression Proben des Mediums zur gelelektrophoretischen Analyse entnommen (siehe Kap. 3.10.2). Abb. 4.43 zeigt die Ergebnisse des Expressionstests.

Das SDS-Gel der drei Klone und der Negativkontrolle zeigt eine Vielzahl von Banden (Abb. 4.43 A). Zwar sekretiert *P. pastoris* neben den heterolog exprimierten Fremdproteinen nur wenige eigene Proteine, jedoch gelangen durch die Lyse eines Teils der Zellen während der langen Kultivierung viele Wirtsproteine ins umgebende Medium, was im Induktionsgel sichtbar ist. Bei etwa 75 kDa ist eine stärkere Bande sichtbar, die der durch Methanol mitinduzierten Alkohol-Oxidase 1 (MW = 73,9 kDa) entsprechen dürfte.

Um ECD-GC-C-6xHis neben dem beträchtlichen Hintergrund an Wirtsproteinen detektieren zu können wurde ein Westernblot durchgeführt (Abb. 4.43 B). Die Detektion erfolgte durch einen polyklonalen anti-6xHis-Antikörper und wurde durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht (Kap. 3.10.3). Abb 42 B zeigt deutlich sichtbare Banden bei etwa 45 kDa die nach drei Tagen in den Überständen aller drei Klone, nicht aber bei der Negativkontrolle, zu erkennen sind. Die Laufhöhe

der Banden steht im Einklang mit dem Molekulargewicht von ECD-GC-C-6xHis (MW = 48,3 kDa) jedoch scheint keine Glykosylierung des Proteins stattgefunden zu haben. In einem weiteren Versuch wurden auch die abzentrifugierten Zellpellets durch Westernblot untersucht, um evtl. intrazellulär vorhandenes ECD-GC-C-6xHis nachzuweisen, wobei jedoch keine Bande detektiert wurde. Insgesamt sind die Konzentrationen des Zielproteins im Medium jedoch relativ gering, da die detektierten Banden zwar deutlich sichtbar, aber trotzdem relativ schwach waren. Ein Vergleich der Bandenintensitäten bei den drei Klonen ergab, dass Klon 3 vermutlich die höchste Expressionsrate von ECD-GC-C-6xHis aufwies. Dieser Klon wurde ausgewählt um in einem großen Kulturvolumen und unter Verwendung eines Fermenters eine größere Menge des Zielproteins zu produzieren

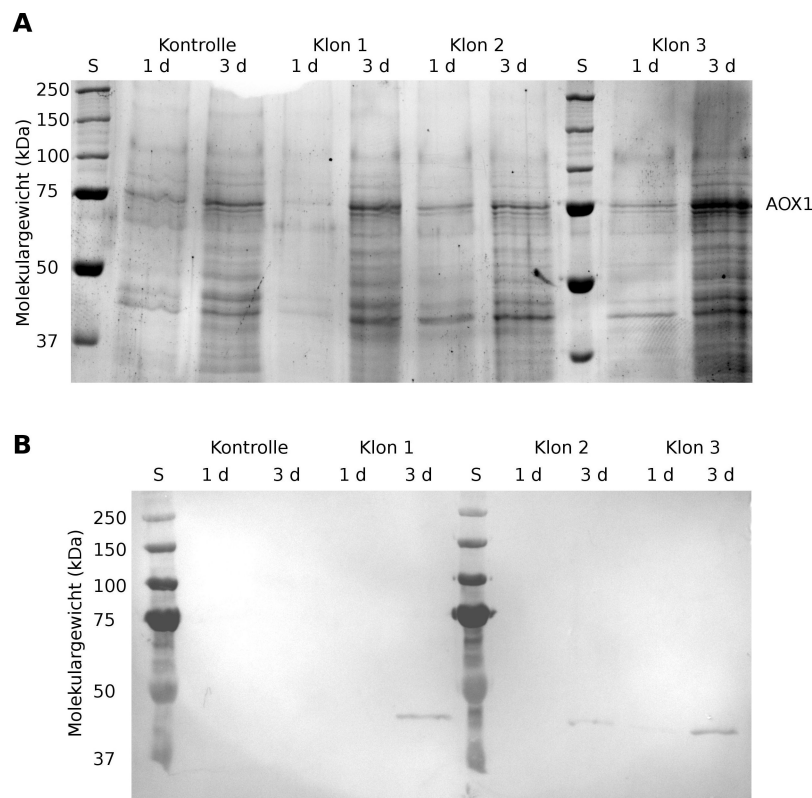


Abb. 4.43: Expressionstest in *P. pastoris* GS115. A) Expressionsgel. B) Westernblot. Die Detektion von sekretiertem Protein erfolgte über einen primären anti-6xHis-Antikörper. Untersucht wurden 3 Klone von *P. pastoris* GS115 pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis die auf Selektionsmedium mit 3 mg/ml Geneticin gewachsen sind. Als Negativkontrolle wurde *P. Pastoris* GS115 pPIC9K verwendet. Proben des Mediums wurden 1 bzw. 3 Tage nach Beginn der Methanolfütterung genommen, durch TCA-Fällung um den Faktor 10 aufkonzentriert und auf 10 % SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen.

#### 4.4.3.3 Fermentation von *P. pastoris* GS115 pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis

Durch Fermentation von *P. pastoris* kann in vielen Fällen eine verglichen mit der Anzucht in Schüttelkolben bedeutend höhere Ausbeute an rekombinantem Protein erzielt werden (Cereghino *et al.*, 2002). Dies liegt in erster Linie daran, dass den kultivierten Zellen wesentlich mehr gelöster Sauerstoff zur Verfügung steht. Da Sauerstoff in Schüttelkolben in der Regel der wachstumslimitierende Faktor ist und v. a. der Katabolismus von Methanol sehr viel Sauerstoff verbraucht, erlaubt der Einsatz von Fermentern das Erreichen von wesentlich höheren Zelldichten (bis ca. 200 mg/ml Nasszellgewicht), was mit einer verstärkten Produktion des Zielproteins einhergeht. Außerdem wird während der Fermentation die Kohlenstoffquelle, Glycerol oder Methanol, kontinuierlich zugesetzt, so dass über die gesamte Dauer der Proteinexpression günstige Wachstumsbedingungen beibehalten werden können.

Für die Fermentation von *P. pastoris* GS115 pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis wurden 5 l Fermentationsmedium in einem Fermenter mit 10 l Gesamtvolumen verwendet (siehe Kap. 3.33). Eine 250 ml BMGY-Starterkultur mit  $OD_{600} = 5,5$  wurde verwendet um den Fermenter anzupfen. Die Fermentation wurde bei 29 °C durchgeführt und die Kultur wurde mit 800 rpm gerührt und mit 10 l/min belüftet um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Durch regelmäßige Zugabe von 25 % Ammoniak, das gleichzeitig als Stickstoffquelle diente, wurde der pH des Mediums während der Fermentation auf einen Wert von 6 eingestellt.

Während der Fermentation wurde der im Medium gelöste Sauerstoff durch eine pO<sub>2</sub>-Elektrode beobachtet. Außerdem wurde in regelmäßigen Abständen, mindestens zweimal am Tag, die Zelldichte der Kultur bestimmt (siehe Kap. 3.8).

Insgesamt gliederte sich der Fermentationsverlauf in drei Phasen (Abb. 4.44) und orientierte sich an den Vorgaben von Invitrogen (Invitrogen, 2002). In der sog. Glycerol-Batch-Phase wuchsen die Zellen solange ohne externe Zugabe, bis die im Fermentationsmedium enthaltenen 4 % Glycerol gänzlich verbraucht waren und erreichten dabei innerhalb von etwa 23 h eine Zelldichte von 108 mg/ml. Das Ende dieser Phase wurde durch einen abrupten Anstieg des in der Kultur gelösten Sauerstoffs angezeigt. In einer zweiten Fermentationsphase, der sog. Glycerol-Fütterung, wurde mit einer Rate von 1,5 ml/min 50 % Glycerol zugegeben um die Zelldichte der Kultur vor der eigentlichen Expression des Zielproteins weiter zu erhöhen. Die Glycerol-Zugabe wurde für 9,5 h aufrechterhalten. Eine Stunde vor dem Ende der Glycerol-Zugabe wurden der Kultur insgesamt 10 ml Methanol zugesetzt um die Expression von Enzymen zum Methanol-Abbau zu induzieren. Etwa eine Stunde nach dem Ende der Glycerol-Zugabe zeigte ein weiterer Anstieg des gelösten Sauerstoffs das Ende der zweiten Fermentationsphase an. Die Kultur hatte zu diesem Zeitpunkt eine

Zelldichte von 185 mg/ml erreicht. In der dritten Phase der Fermentation wurden 0,2 ml/min Methanol zugegeben. Damit wurde die Expression des Zielproteins induziert. Die Methanol-Zugabe erfolgte über einen Zeitraum von vier Tagen. Während dieser Zeit nahm die Zelldichte der Kultur zwar weiterhin zu, jedoch wesentlich langsamer als unter den Bedingungen der Glycerol-Fütterung. Am Ende der vier Tage erreichte die Kultur eine Zelldichte von etwa 240 mg/ml und wurde geerntet, wobei Überstand und Zellpellets bis zur weiteren Analyse getrennt aufbewahrt wurden.

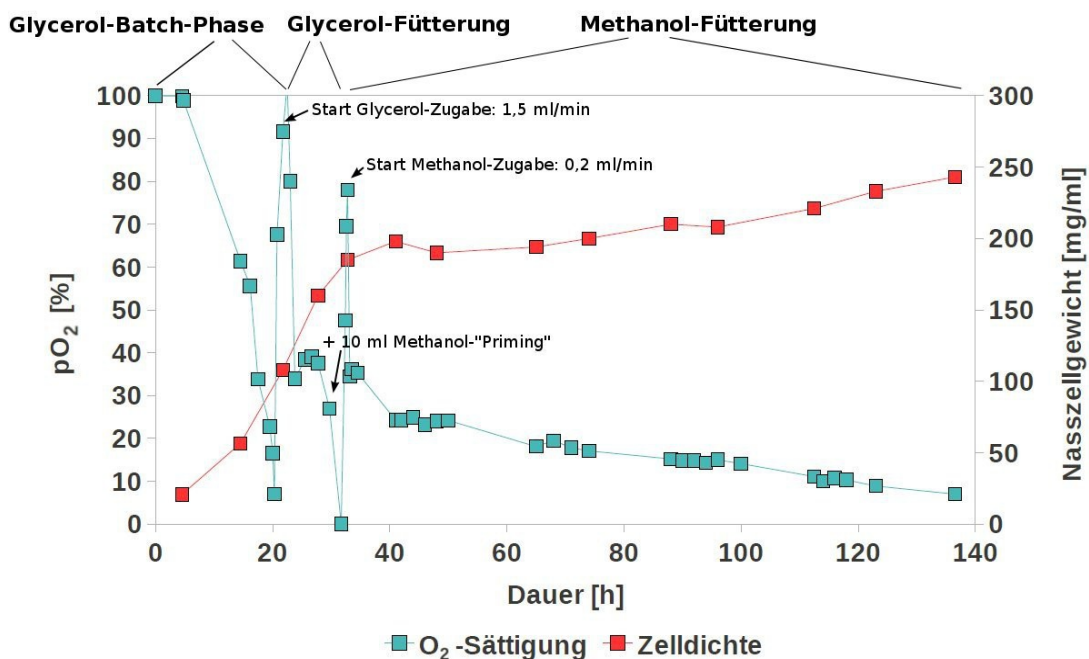


Abb. 4.44: Verlauf der Fermentation von *P. pastoris* GS115 pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis (Klon 3). Über die Dauer der Fermentation (5 Tage 17 Stunden) wurden die Entwicklung des Anteils an im Medium gelösten Sauerstoff sowie das Nasszellgewicht der Zellen beobachtet. Die Fermentation kann in 3 Phasen unterteilt werden: 1) Glycerol-Batch-Phase; 2) Glycerol-Fütterung; 3) Methanol-Fütterung.

Abb. 4.45 zeigt SDS-Gel und Westernblot der Fermentation, wobei jeweils Proben des Mediums und der Zellpellets aufgetragen sind. Während im Expressionsgel des Überstands nur relativ schwache Banden erkennbar sind, zeigt der Westernblot (Abb. 4.45 B) eine deutlich sichtbare Bande bei etwa 90 kDa sowie zwei schwächere Banden bei etwa 60 und 180 kDa. In den Proben der Zellpellets ist dagegen keine spezifische Bande erkennbar. Überraschend ist, dass das Muster der detektierten Banden bei der Fermentation überhaupt nicht mit dem Ergebnis des

Expressionstests (Abb. 4.43 B) übereinstimmt. Möglicherweise handelt es sich bei den hier detektierten Banden um differentiell glykosylierte Formen von ECD-GC-C, die so bei der Expression im Schüttelkolben nicht sekretiert wurden.

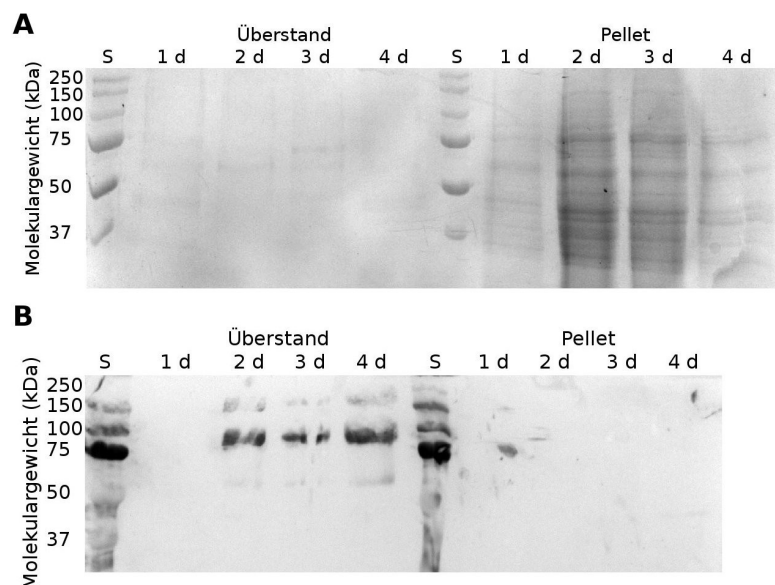


Abb. 4.45: Fermentation von *P. pastoris* GS115 transformiert mit *pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis* (Klon 3). A) Expressionsgel. B) Westernblot mit primärem anti-6xHis Antikörper. Aufgetragen wurden jeweils Proben aus dem Medium sowie den Zellextrakten, die 1 d, 2 d, 3 d und 4 d nach dem Beginn der Methanolfütterung gezogen wurden.

Der Überstand der Kultur wurde direkt nach der Ernte auf 4 °C abgekühlt, der pH durch Zugabe von NaOH auf 7,5 eingestellt und anschließend wurde er auf eine Nickelionen-Affinitätschromatographie-Säule aufgetragen. Aufgrund des großen Volumens dauerte dieser Schritt ca. 30 h. Die Elution der Säule zeigte jedoch, dass keinerlei Protein spezifisch an die Säule gebunden hatte. In einem anschließend durchgeführten Westernblot konnte das Protein weder im Durchfluss der Säule, noch in Fraktionen der Elution nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass ECD-GC-C-6xHis im Überstand der Fermentation nur geringe Stabilität besitzt und innerhalb der etwa 33 Stunden, die die Chromatographie des Überstands in Anspruch nahm, abgebaut wurde.

#### 4.4.4 Expression der extrazellulären Domäne von GC-C in Säugerzellen

Die Expression der ECD von GC-C wurde in einem weiteren Expressionssystem getestet. Da es sich gezeigt hat, dass mit *P. pastoris* kein Fragment von GC-C stabil exprimiert und gereinigt werden konnte, wurden Säugerzellen als mögliche Alternative ausgewählt. Die Ausarbeitung eines Expressionsprotokolls erfolgte mit Hilfe von Dr. Hanna Berkner und im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Martin Klose aus dem Laboratorium von Prof. Dr. Markus Missler (Westfälische Wilhelms-Universität Münster).

##### 4.4.4.1 DNA-Konstrukt für die Expression der ECD von GC-C

Die der Expression zugrundeliegende Strategie wird im Labor von Prof. Missler erfolgreich zur Expression von Proteinen angewendet. Als Konstrukt für die transiente Transfektion von Säugerzellen diente ein modifizierter pCMV5-Vektor (Kap. 3.2.4). In diesem Plasmid befindet sich die Transkription des Fremdgens unter der Kontrolle des Promotors von humanem Cytomegalovirus (CMV). Außerdem enthält es DNA-Sequenzen, die für das N-terminale Sekretionssignal von Neurexin-1 (NRXN) sowie eine C-terminal von der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) gelegene IgG-Fusion kodieren. Der IgG-Fusionspartner dient zur Reinigung des Gesamtproteins durch Affinitätschromatographie mit Protein A Separose Beads (Kap. 3.7). In die MCS wurde das Gen der ECD von GC-C mit einer C-terminalen Thrombin-Proteaseschnittstelle kloniert. Das damit erhaltene Konstrukt wurde mit pCMV\_Nrxn\_ECD-GC-C-Thr bezeichnet (siehe Anhang, Kap. 10.1.11).

##### 4.4.4.2 Expressionsversuche in HEK 293T und COS-7 Zellen

Zur Expression der Konstrukte wurden die Zelllinien COS-7 (abgeleitet von Nierenzellen der Westlichen Grünmeerkatze *Chlorocebus sabaeus*) und HEK 293T (engl. *human embryonic kidney cells*) verwendet. Die Zellen wurden in 10 cm Petrischalen mit DMEM-Medium, 10 % Fetalem Rinderserum und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung angezogen und bei Erreichen von etwa 50 % Konfluenz mit dem Expressionsplasmid transfiziert. Insgesamt wurden pro Zelltyp 2 Petrischalen mit insgesamt 20 ml Kulturmedium angezogen. COS-7 Zellen wurden unter Verwendung der sog. DEAE Dextran Methode und HEK 293T Zellen durch die Calciumphosphat-Methode transfiziert (siehe Kap. 3.34.2). Da es sich um eine transiente Transfektion der Zellen handelt, ist es nicht

notwendig, den Expressionsvektor in den Zellen durch die Verwendung eines Selektionsmittels, etwa eines Antibiotikums, zu stabilisieren. Etwa 14 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium der Kulturen zu DMEM mit 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung gewechselt, da im Fetalen Rinderserum IgG-Proteine enthalten sind, die bei der Reinigung des Zielproteins aus dem Medium stören würden. Die Expression des Fusionsproteins erfolgte für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung. Anschließend wurden die Überstände geerntet. Aus diesen wurde das Fusionsprotein durch die hochaffine Wechselwirkung des IgG-Anhangs mit Protein A Sepharose Beads isoliert (siehe Kap. 3.34.3). Zur Kontrolle der Expression wurde anschließend ein Teil Beads mit gebundenem ECD-GC-C-Thr-IgG in SDS-Puffer gelöst und durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.46).

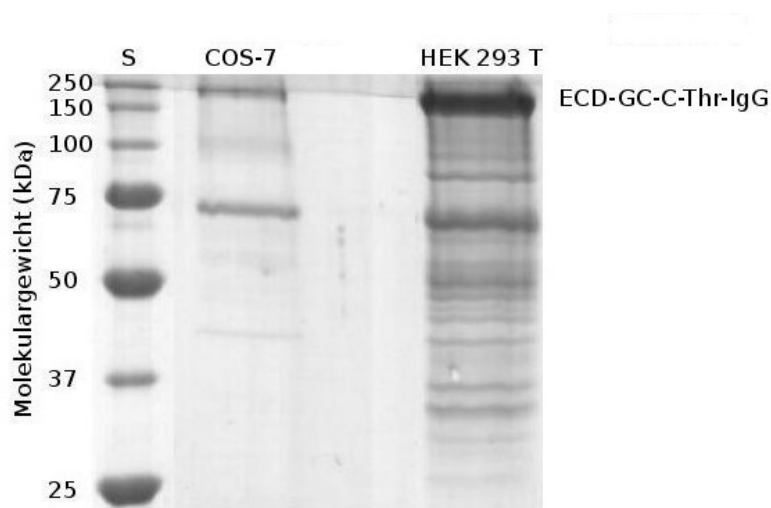


Abb. 4.46: Expression der ECD-GC-C-Thr-IgG in COS-7 und HEK 293T Zellen. 12 % SDS-Polyacrylamidgel beladen mit den durch Protein A Beads isolierten Proteine aus dem Kulturüberstand. Aufgetragen ist jeweils die Menge an Protein, die in 10 ml Kulturmedium enthalten ist. S: Molekulargewichtsstandard

Aus Abb. 4.46 geht hervor, dass in den Überständen der HEK 293T Zellen deutlich mehr Protein enthalten ist als in den Überständen der COS-7 Zellen. In allen Überständen ist eine intensive Bande bei etwa 230 – 250 kDa zu erkennen, bei der es sich um das sekretierte Zielprotein in dimerer Form handelt. Die starke Dimerisierung ist auf den IgG-Fusionsanhang zurückzuführen, wie aus Kontrollexperimenten, bei denen nur IgG exprimiert wurde, hervorgeht (siehe Kap. 4.4.4.3).

Wegen der größeren Expressionsrate der HEK 293T Zellen, wurden diese für die weiteren Versuche verwendet.



Nach den beschriebenen Expressionstests wurde eine größere Kultur von HEK 293T Zellen, 27 Petrischalen mit insgesamt 270 ml Kulturmedium, mit pCMV\_Nrxn\_ECD-GC-C-Thr transfiziert. Als Negativkontrolle wurde eine 10 ml Petrischale mit H<sub>2</sub>O transfiziert. Außerdem wurden die Zellen in einer weiteren Schale mit dem leeren pCMV\_Nrxn Vektor, der nur für IgG kodiert, transfiziert. Die Anzucht wurde wie bei den Expressionstests beschrieben durchgeführt und nach drei Tagen wurden die Zellüberstände geerntet und das sekretierte Fusionsprotein mit Protein A Beads isoliert. Außerdem wurde ein Teil der Zellen lysiert. Abb. 4.47 A zeigt ein SDS-Acrylamidgel auf dem die Kulturüberstände und Zelllysate der angezogenen Zellen, inklusive beider Kontrollen, analysiert wurden.

Sowohl im Kulturüberstand als auch im Zelllysate ist jeweils eine intensive Bande bei etwa 250 kDa zu erkennen, die dem dimerisierten Fusionsprotein entspricht (Abb. 4.47 A, Bahnen 4 und 5). Dies konnte auch durch einen Peptidmassen-Fingerprint nachgewiesen werden (siehe Kap. 3.36). Die IgG-Kontrolle zeigt sehr dicke Banden, die einer großen Menge an sekretiertem IgG im Zellüberstand entsprechen. Die Bande, die IgG entspricht, wandert auf einer Höhe von etwa 54 kDa und repräsentiert ein IgG-Dimer. Das monomere IgG, mit einem Molekulargewicht von 26,8 kDa, wird erst nachdem die Gelprobe für 10 min bei 95 °C gekocht wurde, detektierbar (Abb. 4.47 A, Bahnen 1 und 2 bzw. 7 und 8). Weiterhin fällt auf, dass in den Proben der mit pCMV\_Nrxn\_ECD-GC-C-Thr transfizierten Zellen deutlich mehr Fremdbanden detektierbar sind als in der Negativkontrolle, die mit Wasser transfiziert wurde (Abb. 4.47 A, Bahnen 3 und 6). Auch in der IgG-Kontrolle sind weniger intensive fremde Banden zu erkennen. Aus diesem Befund wird geschlossen, dass es sich bei den Fremdbanden nicht um Wirtsproteine handelt, sondern vermutlich um Fragmente des exprimierten Fusionsproteins, welche durch proteolytischen Abbau entstehen. Das exprimierte ECD-GC-C-Thr-IgG weist wohl nur eine stark begrenzte Stabilität im Kulturüberstand der Zellanzucht auf.

#### **4.4.4.3 Einfluss der Glykosylierung auf die Expression von ECD-GC-C-Thr-IgG in HEK 293T**

In einem weiteren Experiment wurde die Proteinexpression in Gegenwart von 2,5 µg/ml Tunicamycin durchgeführt und die Ergebnisse durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.47 B).

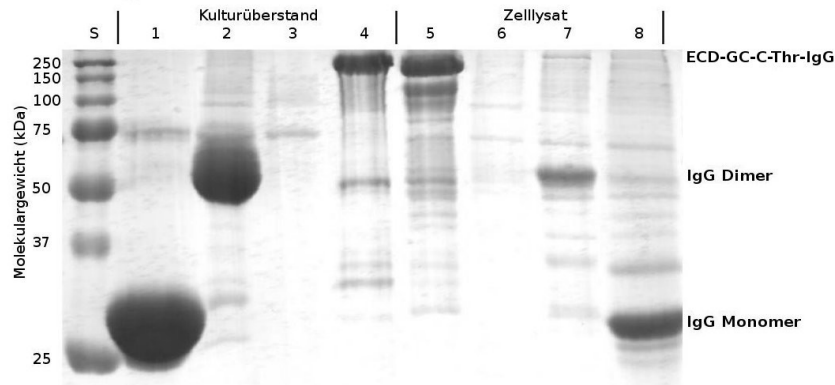
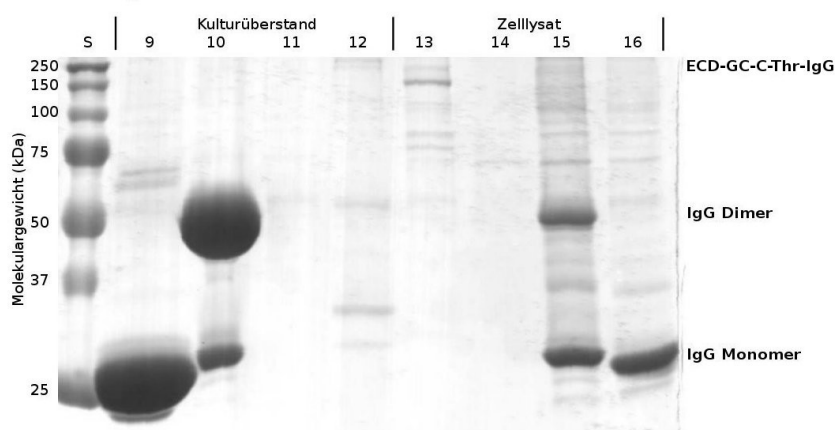
**A - Tunicamycin****B + Tunicamycin**

Abb. 4.47: Expression von *pCMV\_Nrxn\_ECD-GC-C-Thr* in HEK 293T. 12 % SDS-Polyacrylamidgele die mit Proben von aus Kulturüberständen isoliertem Protein und Zelllysaten beladen wurden. Die Expression erfolgte in A) Abwesenheit bzw. B) Gegenwart von 2,5 µg/ml Tunicamycin. Als Kontrollen wurden Zellen verwendet, die mit Wasser oder *pCMV\_Nrxn* transfeziert wurden. S: Molekulargewichtsstandard; 1 und 9: Kulturüberstand der mit *pCMV\_Nrxn* transfezierten Zellen, Probe gekocht; 2 und 10: Kulturüberstand der mit *pCMV\_Nrxn* transfezierten Zellen, Probe nicht gekocht; 3 und 11: Kulturüberstand der mit Wasser transfezierten Zellen; 4 und 12: Kulturüberstand der mit *pCMV\_Nrxn\_ECD-GC-C-Thr* transfezierten Zellen; 5 und 13: Zelllysate der mit *pCMV\_Nrxn\_ECD-GC-C-Thr* transfezierten Zellen; 6 und 14: Zelllysate der mit Wasser transfezierten Zellen; 7 und 15: Zelllysate der mit *pCMV\_Nrxn* transfezierten Zellen, Probe nicht gekocht; 8 und 16: Zelllysate der mit *pCMV\_Nrxn* transfezierten Zellen, Probe gekocht.

Die aufgetragenen Proben der Kulturüberstände entsprechen jeweils dem in 10 ml (Kontrollen, Banden 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16) bzw. 30 ml (Zielprotein, Banden 4, 5, 12, 13) Medium enthaltenen Protein.

Tunicamycin inhibiert die Synthese von N-Glykanen und resultiert somit in der Expression von nicht glykosyliertem ECD-GC-C-Thr-IgG (Tkacz & Lampen, 1975). Abb. 4.47 B zeigt, dass nach Verwendung von Tunicamycin im Nährmedium, kaum ECD-GC-C-Thr-IgG in Kulturüberstand und Zelllysate detektierbar war, ganz im Gegensatz zur IgG-Kontrolle, bei der kein großer Einfluss von Tunicamycin auf die Menge an exprimiertem Protein erkennbar war. Offensichtlich wird durch die fehlende Glykosylierung entweder die Expression des Fusionsproteins stark gehemmt oder seine Stabilität so stark reduziert, dass das exprimierte Protein schnell abgebaut wird.

#### 4.4.4.4 Stabilität von isoliertem ECD-GC-C-Thr-IgG

Das aus dem Kulturüberstand der HEK 293T Zellen isolierte ECD-GC-C-Thr-IgG Fusionsprotein war durch die von seinem IgG-Anhang vermittelte hochaffine Wechselwirkung an die Protein A Sepharose gebunden. Da in diesem Zustand eine weitere Charakterisierung des Proteins unmöglich ist, musste es von den Beads eluiert werden. Dazu standen zwei Strategien zur Verfügung. Die Elution des Gesamtproteins durch einen sehr sauren Puffer (50 mM Glycin; pH 1,8; 100 mM NaCl), bei dem die Interaktion von IgG und Protein A aufgehoben wird, oder die Spaltung des Fusionsproteins durch Thrombin, bei der ECD-GC-C freigesetzt wird. Die erste erwähnte Strategie eignet sich nicht zur Reinigung des Proteins, da es bei dem niedrigen pH-Wert zur irreversiblen Entfaltung der ECD von GC-C kommt. Dies wurde von Dr. Hanna Berkner und Dr. Martin Klose in einem Experiment überprüft, in dem durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie keine Wechselwirkung zwischen dem sauer eluierten Fusionsprotein und Uroguanylin bzw. STh nachgewiesen werden konnte. Um das an die Protein A Beads gebundene Fusionsprotein zu spalten wurden diese in Thrombin-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) gewaschen und resuspendiert. Nach Zugabe von Thrombin wurde die Probe für 16 h bei 4 °C inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.48).

Nach der Thrombin-Spaltung kann an den Protein A Sepharose Beads der gespaltene IgG-Fusionspartner deutlich nachgewiesen werden. Im Überstand der Thrombin-Spaltung kann jedoch kein lösliches ECD-GC-C nachgewiesen werden (Abb. 4.48, Bahnen 3 und 4). Zudem sind an den Beads verschiedene schwache Banden detektierbar, die auf einen Abbau des Proteins hinweisen könnten. Möglicherweise kommt es zu unspezifischer Spaltung des rekombinanten Proteins durch die Thrombin-Protease (Di Cera & Cantwell, 2001) oder aber andersartiger Wirtsproteasen, die in der Probe mitgeschleppt werden. Der Überstand der Thrombin-Spaltung zeigte noch eine schwache Absorption bei 280 nm ( $A_{280} = 0,1$ ), die einer Konzentration von ECD-GC-C von 1,7  $\mu\text{M}$

entsprechen würde ( $V = 800 \mu\text{l}$ ). Jedoch konnte, aufgrund der geringen Probenmenge, durch SDS-PAGE nicht geklärt werden, ob es sich dabei um ein Protein mit der passenden Größe handelte.

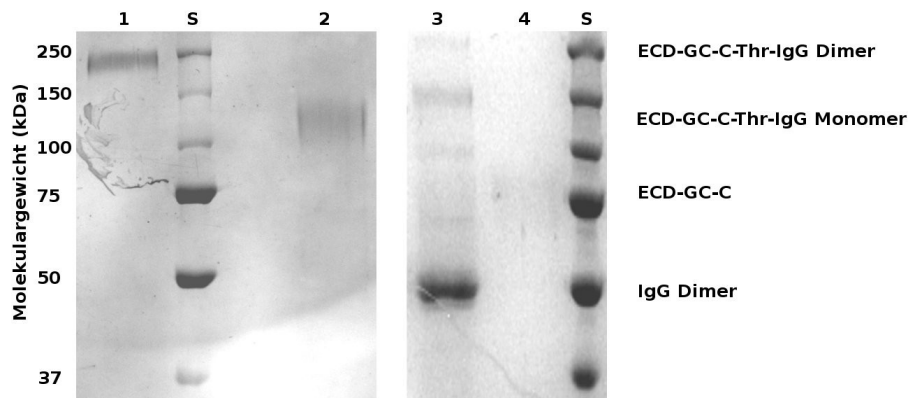


Abb. 4.48: Stabilität von ECD-GC-C-Thr-IgG nach der Isolierung aus dem Kulturüberstand von HEK 293T Zellen. S: Molekulargewichtsstandard; 1: Protein A Beads beladen mit ECD-GC-C-Thr-IgG, Probe nicht gekocht; 2: Protein A Beads beladen mit ECD-GC-C-Thr-IgG, Probe gekocht; 3: Protein A Beads nach Thrombin-Spaltung, Probe nicht gekocht; 4: Überstand der Thrombin-Spaltung, durch Vivaspins MWCO 10000 ca. 5fach aufkonzentriert. Die in Bahnen 1 und 2 aufgetragene Probe entspricht dem aus 40 ml Kulturüberstand isolierten Protein.

## 5 Diskussion

Zur biophysikalischen Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen der Rezeptordomäne von GC-C und den Peptidliganden Uroguanylin und STh ist es nötig, die Bindungspartner in genügender Menge und für *in vitro* Experimente ausreichender Reinheit zur Verfügung zu haben. Peptide werden üblicherweise durch automatisierte chemische Synthese hergestellt. Dies ist prinzipiell auch für die Liganden der GC-C möglich, jedoch erfordert die oxidative Faltung der Peptide, aufgrund ihres komplexen Disulfidverbrückungsmusters, den extensiven Einsatz orthogonaler Schutzgruppen. Dies vergrößert den Syntheseaufwand, erhöht die Anzahl möglicher Nebenprodukte und verringert die Ausbeute an biologisch aktiven Produkten (Ikemura *et al.*, 1984; Gali *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung verschiedener Agonisten von GC-C in *E. coli* entwickelt. Rekombinante Expressionsstrategien sind relativ kostengünstig und erlauben meist ein einfaches Scale-up der Produktion. Hinzu kommt, dass die Expression in *E. coli* die Möglichkeit bietet, das produzierte Peptid auf einfachem Weg mit NMR-aktiven Isotopen zu markieren, was eine wichtige Voraussetzung für NMR-Bindungsstudien darstellt.

### 5.1 Rekombinante Expression von Uroguanylin

Die Primärstrukturen von Proguanylin und Prouroguanylin zeichnen sich durch 35 % Identität aus. Proguanylin enthält jedoch in seinem mittleren Sequenzabschnitt sieben Aminosäuren, die eine nicht strukturierte, flexible Schleife bilden und bei Prouroguanylin keine Entsprechung haben (Lauber *et al.*, 2003). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Deletion dieser Sequenz nur geringfügige Änderungen der Lösungsstruktur zur Folge hat, so dass angenommen werden kann, dass die Tertiärstrukturen von Proguanylin und Prouroguanylin im Wesentlichen übereinstimmen (Lauber, 2003). Diese Annahme wird auch durch die ähnlichen funktionellen Eigenschaften beider Proteine unterstützt. So gilt für beide Proteine, dass die Propeptide essentiell für die korrekte Faltung der jeweiligen Hormonregionen sind (Hidaka *et al.*, 1998). Außerdem konnte für Prouroguanylin, wie auch für Proguanylin, durch Deletionsexperimente eine wichtige Rolle der N-Termini für die Faltung der C-terminalen Sequenzbereiche gezeigt werden (Schulz *et al.*, 1999; Hidaka *et al.*, 2000). Die oxidative Faltung zum biologisch aktiven Hormon gelingt weder mit freiem Guanylin noch mit freiem Uroguanylin (Hidaka *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 1999). Dies steht im Gegensatz zu anderen kleinen disulfidverbrückten Peptiden wie Endothelin (Yanagisawa *et al.*,

1988) und  $\omega$ -Conotoxinen (Price-Carter *et al.*, 1996a), die mit relativ guten Ausbeuten zu ihrer nativen Form oxidiert werden können.

Eine Prosequenz-vermittelte Faltung wurde bei einer Reihe von anderen Proteinen beobachtet, darunter der Trypsin-Inhibitor BPTI aus der Bauchspeicheldrüse von Rindern (Weissman & Kim, 1992), das Zytokin MIC-1 (Fairlie *et al.*, 2001) oder der humane Nervenwachstumsfaktor NGF (Rattenholl *et al.*, 2001). Bei einigen Conotoxinen unterstützt das Propeptid die Faltung indirekt, indem es die Disulfidisomerase-abhängige Ausbildung der Disulfidbrücken erleichtert (Buczek *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde Uroguanylin rekombinant hergestellt. Dazu wurde das Prohormon Prouroguanylin in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Anschließend wurde Uroguanylin durch proteolytischen Verdau mit Trypsin freigesetzt und aus dem Spaltansatz aufgereinigt. In einer früheren Arbeit wurde bereits gezeigt, dass Prouroguanylin in *E. coli* exprimiert und in für NMR-Spektroskopie ausreichender Menge gereinigt werden kann (Schuster, 2004). Jedoch konnte damals das Hormon Uroguanylin nicht in reiner Form aus dem Prohormon freigesetzt werden.

Zur rekombinanten Expression von Prouroguanylin wurde in dieser Arbeit das Plasmid pET32a-Asp-pres-prouroguanylin im *E. coli* Stamm Origami B (DE3) als Fusionsprotein Trx-Prouroguanylin exprimiert. Da die oxidative Faltung von Prouroguanylin *in vitro* zur Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken führt (Hidaka *et al.*, 1998) wurde davon ausgegangen, dass die Faltung des Proteins auch im oxidativen Milieu des Cytoplasmas von Origami B (DE3) glückt.

Nach der Induktion kam es zu einer starken Expression des Fusionsproteins (Abb. 4.1). Der verwendete Stamm Origami B (DE3) hat gegenüber früher verwendeten, Leucin-auxotrophen *E. coli* Stämmen, etwa Origami (DE3) oder AD494 (DE3), den Vorteil wesentlich schnelleren Zellwachstums und damit einer höheren Ausbeute des Zielproteins. Während der Lyse der Zellen konnte das Auftreten eines weißlichen Präzipitats beobachtet werden. Dabei handelt es sich um schwer lösliche sog. Einschlusskörperchen, die im Wesentlichen aus rekombinantem Protein bestehen. Bei Trx-Proguanylin zeigte sich, dass nach dem Zellaufschluss der weitaus größte Teil des Fusionsproteins im löslichen Überstand enthalten ist (Lauber, 2003). Dies steht im Gegensatz zu Trx-Prouroguanylin, das größtenteils im unlöslichen Pellet zu finden ist. Das Lysepellet wurde mit 4 M Harnstoffpuffer extrahiert, was zur Solubilisierung großer Mengen des Fusionproteins führte (Abb. 4.2). Die Rückfaltung erfolgte vor der chromatographischen Reinigung durch Verdünnung des Harnstoffs. Bei der Spaltung des gereinigten Fusionsproteins mit PreScission-Protease wird Prouroguanylin freigesetzt, wobei allerdings auffällt, dass der Verdau nicht vollständig verläuft (Abb. 4.4). Dies lässt sich wohl darauf zurückführen, dass etwa 20-25 % des rückgefalteten Fusionsproteins in einer fehlgefalteten Struktur vorliegt, in der die Schnittstelle nicht zugänglich für

PreScission-Protease ist. Nach der Spaltung konnte das freigesetzte Prouroguanylin durch Metallionen-Affinitätschromatographie von noch vorhandenem Trx-Prouroguanylin und freiem Trx getrennt werden.

$^{15}\text{N}$ -markiertes Prouroguanylin konnte im Wesentlichen auf gleichem Weg wie unmarkiertes Prouroguanylin exprimiert und gereinigt werden. Das  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von Prouroguanylin (Abb. 4.6) zeigt eindeutige Charakteristika eines gefalteten Proteins, wobei insbesondere die starke Dispersion der Signale entlang der Protonendimension hervorzuheben ist. Augenfällig am vorliegenden Spektrum ist die Tatsache, dass mit 155 detektierten Rückgratamidsignalen etwa doppelt so viele Resonanzen zu beobachten sind, als die Sequenz des Proteins erwarten ließe. Außerdem gibt es bei den Signalen im Spektrum starke Intensitätsunterschiede, v. a. auch bei einigen Signalen, die paarweise dicht beieinander liegen. Das Spektrum sieht aus, als liege das Protein in zwei verschiedenen populierte Konformationszuständen vor. Möglicherweise ist dies ein Resultat einer unvollständigen Rückfaltung, so dass ein Teil des Proteins nicht die native Struktur einnimmt. Es kann sich auch um ein Gleichgewicht zweier Konformere des Proteins handeln, die im langsamen Austausch zueinander stehen. Eventuell ist auch *cis/trans*-Isomerie der 7 in der Sequenz vorkommenden Proline ein Grund für das Auftreten von paarweise beieinanderliegenden Peaks. Im  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von Proguanylin ist ein derartiges Auftreten von verschiedenen populierte Konformationszuständen jedoch nicht erkennbar {(Lauber, 2003)}.

Die Freisetzung von Uroguanylin erfolgte durch die Spaltung des Prohormons mit Trypsin. Da Trypsin am C-Terminus der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, wird Prouroguanylin in eine Reihe kleinerer Peptidfragmente verdaut, darunter auch das 19 Aminosäuren lange C-terminale Fragment TIANDDCELCNVNACTGCL. Dieses unterscheidet sich von der in Urin nachgewiesenen Form (Abb. 1.2) (Kita *et al.*, 1994) durch die drei zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren Threonin, Isoleucin und Alanin. Da unbekannt ist, durch welche Enzyme das natürliche Prouroguanylin prozessiert wird und aus natürlichen Quellen nur das bereits erwähnte 16 Aminosäuren lange Uroguanylin sowie ein weiteres 24 Aminosäuren langes, ebenfalls biologisch aktives Fragment isoliert werden konnten (Hess *et al.*, 1995) wurde mit dem durch die Trypsin-Spaltung erhaltenen Peptid weitergearbeitet, zumal dieses die gesamte für die Bioaktivität notwendige Kernregion enthält.

Bei der Reinigung von Uroguanylin aus dem Spaltansatz durch Umkehrphasen-HPLC erhält man bei einer Acetonitril-Konzentration von etwa 24 % (v/v) einen Elutionsgipfel, der das Uroguanylin-Peptid enthält (Abb. 4.7). Der Nachweis der Identität erfolgte durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Der Elutionsgipfel im HPLC-Chromatogramm besitzt allerdings eine

Schulter was darauf hindeutet, dass zwei molekulare Spezies mit ähnlichem Elutionsverhalten darin enthalten sind. Die massenspektrometrische Analyse zusammen mit NMR-Spektren der Teilbereiche des Elutionsgipfels zeigte, dass es sich bei den beiden molekularen Spezies um ein und dasselbe Peptidfragment handelt, dass jedoch zwei unterschiedliche Strukturen annimmt, die durch die verwendete Polystyrol/Divinylbenzol-Säule nur unzureichend voneinander getrennt werden können. Durch NMR-Spektroskopie und Vergleich der chemischen Verschiebungen mit den Literaturwerten für die A-Form von Uroguanylin (Marx *et al.*, 1998) konnte jedoch gezeigt werden, dass der größere und etwas später eluierende Teil des Elutionsgipfels dem aktiven Uroguanylin-Peptid entspricht (Abb. 4.9 und Anhang 10.2). Da die chemischen Verschiebungen der anderen Spezies jedoch nicht mit den Literaturwerten der B-Form von Uroguanylin (Marx *et al.*, 1998) übereinstimmen, spiegelt das Auftreten zweier Isomere des Uroguanylin-Peptids nicht die bekannte Topoisomerie von Uroguanylin wider. Stattdessen handelt es sich bei der Verunreinigung vermutlich um ein fehlgefaltetes bzw. falsch disulfidverbrücktes Peptid. Das Vorliegen zweier Konformationen des Prohormons, das schon im [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum von Prouroguanylin sichtbar war, führt möglicherweise dazu, dass ein Teil des exprimierten Uroguanylins nicht zum nativen Hormon oxidiert wird. Um dennoch eine möglichst reine Probe von aktivem Uroguanylin zu erhalten wurde nur der hintere Teil des HPLC-Elutionsgipfels gesammelt und vereinigt, was jedoch dazu führt, dass auch ein Teil des Produkts verloren geht. Durch das wiederholte Auftragen auf die HPLC-Säule kann die Trennung der beiden Peptidspezies verbessert und die Ausbeute des nativen Peptids gesteigert werden. Die Resonanzen im NOESY-Spektrum des nativen Peptids (Abb. 4.9) konnten bis auf die Aminosäuren Asn-4 und Asp-5 zugeordnet werden (siehe Anhang 10.2). Diese konnten wegen ihrer ähnlichen chemischen Verschiebungen und dem Fehlen von intraresidualen NOESY-Kreuzsignalen im Bereich des flexiblen N-Terminus des Peptids nicht eindeutig zugeordnet werden. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen mit den Literaturwerten (Marx *et al.*, 1998). Die Abweichungen der hier gemessenen Werte von den chemischen Verschiebungen der Literatur liegen in der Größenordnung 0 – 0,07 ppm. Lediglich für die Amidprotonen der Aminosäuren Asp-3 und Leu-19 betrugen die Differenzen zu den bei Marx *et al.* gemessenen Resonanzen 0,14 und 0,15 ppm. Dies kann für Asp-3 mit einem möglichen Einfluss der zusätzlich vorhandenen Thr-Ile-Ala-Sequenz am N-Terminus und für das C-terminale Leu-19 mit geringfügigen Variationen des pH-Werts erklärt werden. Von den 18 im [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum von Uroguanylin enthaltenen Rückgratamidsignalen konnten 16 eindeutig zugeordnet werden (Abb. 4.10 A). Zudem hat sich gezeigt, dass nach mehrtägiger Inkubation der NMR-Probe bei Raumtemperatur zusätzliche Signale im HSQC-Spektrum der Probe auftauchten (Abb. 4.10 B.). Die chemischen Verschiebungen dieser



zusätzlichen Signale in der Protonendimension stehen im Einklang mit den Literaturwerten für die B-Form von Uroguanylin (Marx *et al.*, 1998), so dass erwartet werden kann, dass es sich bei dem Verhalten der Probe um die beschriebene Topoisomerie von Uroguanylin handelt.

Die massenspektrometrische Analyse der Uroguanylin-Probe (Abb. 4.8) ergab eine Masse von 1975,4 Da, was sehr gut mit der für das  $^{15}\text{N}$ -markierte Peptid erwarteten rechnerischen Masse von 1975,2 Da übereinstimmt und das Vorhandensein zweier Disulfidbrücken im Peptid bestätigt. Die Disulfidverbrückung wurde auch durch den beobachteten Massenzuwachs des Peptids um 4 Da nach Reduktion mit DTT nachgewiesen (Abb. 4.8 B).

Aufgrund dieser Ergebnisse steht nun eine Methode zur Verfügung um das Hormon Uroguanylin auf relativ einfachem Weg über rekombinante Expression des Vorläuferproteins herzustellen. Zwar führt die in einem Teil des Proteins beobachtete Fehlfaltung dazu, dass die Ausbeute kleiner ist als dies bei vollständiger Rückfaltung möglich wäre. Jedoch lassen sich trotzdem mit der hier vorgestellten Strategie Ausbeuten im Bereich 0,2 – 0,3 mg reines Hormon pro Liter Bakterienkultur erzielen, was den Erfordernissen dieser Arbeit genügt.

## 5.2 Rekombinante Expression von *E. coli* STh durch Prosequenz-Austausch

Die hitzestabilen Enterotoxine aus *E. coli* sind deutlich stärkere Agonisten der GC-C als die endogenen Hormone Guanylin und Uroguanylin. Sie binden mit einer gegenüber den endogenen Liganden Guanylin und Uroguanylin etwa zehnfach höheren Affinität an die extrazelluläre Domäne von GC-C (Hamra *et al.*, 1997). Dieser Umstand und die Rolle der Enterotoxin/GC-C-Wechselwirkung für die Pathogenität von ETEC machen STh zu einem interessanten Ziel für die rekombinante Expression.

*In vivo* werden STh und STp jeweils als 72 Aminosäuren enthaltende Vorläuferproteine exprimiert (Okamoto & Takahara, 1990; Rasheed *et al.*, 1990). Das Vorläuferprotein von STh enthält ein 19 Aminosäuren langes Pre-Signalpeptid, das essentiell für die SecA-abhängige Translokation des Proteins über die innere Zellmembran ins Periplasma ist und währenddessen abgespalten wird (Yang *et al.*, 1992; Pugsley, 1993). Daneben enthält das Vorläuferprotein ein 34 Aminosäuren langes Propeptid, dessen genaue Funktion bisher nicht geklärt werden konnte. Es ist nicht essentiell für die Faltung des C-terminalen STh, da Stämme, in denen das Propeptid, nicht aber das Pre-Signalpeptid, deletiert wurde immernoch 40 % der enterotoxischen Aktivität des Wildtyps behalten (Okamoto & Takahara, 1990; Yamanaka *et al.*, 1993). Möglicherweise verlangsamt es die Passage vom Periplasma ins extrazelluläre Medium und sorgt somit dafür, dass genügend Zeit für die im

Periplasma stattfindende Ausbildung der Disulfidbrücken zur Verfügung steht (Yang *et al.*, 1992). Für die Ausbildung der Disulfidbrücken wurde ein von der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase DsbA abhängiger Mechanismus vorgeschlagen (Yamanaka *et al.*, 1994), der aber nicht im Einklang mit anderen Ergebnissen steht, die für eine extrazelluläre DsbA-unabhängige Faltung und extrazelluläre Oxidation sprechen (Batisson & der Vartanian, 2000). Auch ist umstritten, ob die Abspaltung des Propeptids im Periplasma oder im extrazellulären Medium erfolgt (Rasheed *et al.*, 1990; Yamanaka *et al.*, 1997). Ein Fusionsprotein aus STh und der großen Untereinheit ClpG des *E. coli* CS31A Fimbrien-Antigens wird über die äußere Zellmembran ins extrazelluläre Medium transportiert, wo die Oxidation der Cysteine von STh durch molekularen Sauerstoff erfolgt (Batisson & der Vartanian, 2000; Batisson *et al.*, 2000). Allerdings ist dieser Prozess abhängig vom CS31A Sekretionsweg und unterscheidet sich damit wohl beträchtlich vom natürlichen Sekretionsmechanismus von STh.

In vorhergehenden Studien zur rekombinanten Expression von STa wurden genetische Fusionen zwischen dem Enterotoxin und größeren Trägerproteinen wie etwa dem hitzelabilen LT hergestellt (Rosales-Mendoza *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Dies diente hauptsächlich dazu, die schwache Immunogenität des relativ kleinen STa zu erhöhen. Mit diesen Fusionsproteinen wurden anschließend erfolgreich anti-STa-Antikörper induziert. Jedoch wurden die STh-Fusionsproteine nicht in reiner Form erhalten. Andere Strategien zur Herstellung von STa bestehen darin, dieses aus dem Überstand pathogener ETEC-Kulturen zu reinigen (Staples *et al.*, 1980; Aref & Saeed, 2012) oder alternative Exportsignale zu verwenden (Greenberg *et al.*, 1991; Sanchez *et al.*, 1993). Allerdings führen auch diese Methoden dazu, dass ein großer Teil des exprimierten STa fehlgefaltet wird und anschließend vom aktiven Produkt getrennt werden muss (Dwarakanath *et al.*, 1989).

Die in dieser Arbeit etablierte rekombinante Expressionsstrategie von Uroguanylin wurde auf STh übertragen um eine elegante Methode zur Herstellung größerer Mengen des Enterotoxins zu entwickeln (Weiglmeier *et al.*, 2013; Rösch *et al.*, 2013). Sowohl STh als auch das rekombinant hergestellte Uroguanylin-Fragment enthalten jeweils 19 Aminosäuren und ein Vergleich der Sequenzen zeigt, dass die gemeinsamen Disulfidbrücken Cys-7/Cys-15 und Cys-10/Cys-18 innerhalb beider Peptide gleich positioniert sind (Abb. 4.11). Die entwickelte Expressionsstrategie für STh basiert auf folgender Annahme: Werden die C-terminalen 19 Aminosäuren von Prouroguanylin durch die Sequenz von STh ersetzt so kann das Propeptid analog zur Situation in Prouroguanylin auch die Faltung von STh unterstützen. Die Faltung der Peptidkette von STh im Kontext des Prouro-STh Vorläuferproteins positioniert dabei die freien Cysteine so zueinander, dass sich die beiden in Uroguanylin ebenfalls vorhandenen Disulfidbrücken auch innerhalb der STh-Sequenz bevorzugt ausbilden. Die zusätzlich vorhandene, dritte Disulfidbrücke von STh kann sich

dann zwischen Cys-6 und Cys-11 spontan ausbilden. Auf diese Weise wird die Entstehung fehlerhafter Cystinbindungen, wie sie bei der spontanen Oxidation zu erwarten wären, unterdrückt und der Anteil an biologisch inaktiven Nebenprodukten bei der Expression minimiert.

Das Plasmid pET32a-Asp-pres-prouroguanylin wurde als Vorlage zur Erstellung des neuen Konstrukts pET32a-Asp-pres-prouro-STh verwendet. Ein synthetisches 95 bp Gen, das für die STh Aminosäuresequenz kodiert, wurde dabei anstelle der Uroguanylin kodierenden Sequenz in das Plasmid eingefügt.

Das neu konstruierte Plasmid führt in Origami B (DE3) zu einer guten Expression des Fusionsproteins Trx-Prouro-STh (Abb. 4.12). Bei der Reinigung von Trx-Prouro-STh hat sich gezeigt, dass dieses deutlich schlechter löslich war als Trx-Prouroguanylin, was mehrere Anpassungen des für Prouroguanylin entwickelten Expressions- und Reinigungsprotokolls erforderlich machte. So wurde die Temperatur während der Proteinexpression von 37 °C auf 25 °C herabgesetzt. Das starke Ausflocken von Proteinpräzipitat während der Lyse deutet darauf hin, dass auch Trx-Prouro-STh unlösliche Einschlusskörper bildet. Das schwerer lösliche Fusionsprotein musste nach der Lyse jedoch mit 8 M Harnstoff, gegenüber 4 M bei Trx-Prouroguanylin, extrahiert werden. Die weitere Reinigung des Fusionsproteins durch Cobaltionen-Affinitätschromatographie erfolgte dann wie bei Trx-Prouroguanylin. Die Abspaltung des Thioredoxin-Anhangs mit PreScission-Protease verlief mit relativ guter Ausbeute, aber nicht vollständig (Abb. 4.15), wohl aus den gleichen Gründen, die schon bei der Reinigung von Prouroguanylin besprochen wurden.

Auch das reine Prouro-STh zeichnete sich durch eine relativ geringe Löslichkeit aus und konnte nicht auf Konzentrationen > 50 µM konzentriert werden. Das [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-HSQC-Spektrum von <sup>15</sup>N-markiertem Prouro-STh zeigt eine gute Dispersion der Signale entlang der Protonendimension und weist dieses ebenfalls als Protein mit deutlich ausgeprägter Tertiärstruktur aus (Abb. 4.16). Im Spektrum sind keine Paare von Resonanzsignalen zu erkennen, wie dies bei Prouroguanylin der Fall ist (Abb. 4.6). Allerdings ist die Konzentration der Probe und damit die Sensitivität der Signaldetektion auch relativ gering, so dass das Vorliegen kleinerer Mengen einer alternativen Konformation des Proteins nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

Nach der Trypsin-Spaltung und Auftrennung der Peptide durch Umkehrphasen-HPLC kann STh in einem Elutionsgipfel identifiziert werden, dessen Laufverhalten sehr ähnlich zu dem des gleichlangen Uroguanylin-Peptids war. Die korrekte Masse und das Vorliegen von 6 Disulfidbrücken wurde durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt (Abb. 4.17). Dies ist für sich genommen noch kein ausreichender Nachweis, dass STh auch das native Disulfidverbrückungsmuster aufweist. Durch homonukleare NMR-Spektroskopie wurden die Protonenresonanzsignale des gereinigten Peptids zugeordnet (Abb. 4.19) und mit Werten aus der

Literatur verglichen. Die chemischen Verschiebungen der Protonensignale des chemisch synthetisierten, N-terminal verkürzten Peptids STh(6-19), das nur die Aminosäuren der toxischen Domäne enthält, wurden von Matecko *et al.* zugeordnet (Matecko *et al.*, 2008). Die Übereinstimmung der zugeordneten chemischen Verschiebungen mit diesen Literaturdaten ist sehr gut, obwohl sich die beiden Peptide in ihrer Länge deutlich voneinander unterscheiden. Insgesamt liegen die Differenzen zwischen chemischen Verschiebungen äquivalenter Protonen in beiden Peptiden im Bereich 0 – 0,11 ppm, wobei hin zum N-Terminus die jeweils größeren Abweichungen auftreten (siehe Anhang Kap. 10.3). Der größte Unterschied in den NMR-Spektren von rekombinant hergestelltem STh und chemisch-synthetisiertem STh(6-19) besteht darin, dass im ersteren nur die 9 C-terminalen Aminosäuren zugeordnet werden konnten, während im verkürzten Peptid die Zuordnung von 12 C-terminalen Aminosäuren gelang. Bei NMR-Studien von STh(6-19) wurde bereits früher eine starke Verbreiterung der Signale im N-terminalen Bereich des verkürzten Peptids festgestellt, was konformationeller Dynamik in dieser Region und intermediärem Austausch zugeschrieben wurde (Garipey *et al.*, 1986; Matecko *et al.*, 2008). Möglicherweise werden diese Effekte in der Gegenwart des flexiblen N-Terminus von STh noch verstärkt. Insgesamt weisen aber die gute Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen im Bereich der disulfidverbrückten Domäne mit den Werten von chemisch synthetisiertem STh(6-19) auf eine gleiche Konformation des Peptidrückgrats beider Peptide und damit auf eine gleiche Disulfidverbrückung hin.

Um eine endgültige Aussage über die Qualität der rekombinant hergestellten GC-C-Agonisten, Uroguanylin und STh, zu erhalten musste noch ein Nachweis ihrer biologischen Aktivität erbracht werden. Zur Bestimmung der Aktivität von Liganden der GC-C wurden in der Literatur eine Reihe von Testsystemen entworfen:

- Ein weit verbreitetes Verfahren zur Aktivitätsbestimmung von Enterotoxinen ist der sog. Mäusesäugling-Test (engl.: *suckling mouse assay*, SMA) bei dem Proben mit enterotoxischer Aktivität durch intragastrische oder subkutane Injektion an Mäusesäuglinge verabreicht werden und nach definierten Inkubationszeiten die Zunahme des Verhältnisses aus Darm- und Körpermasse relativ zu Kontrolltieren quantifiziert wird (Giannella, 1976). Dies ist ein Maß für die durch das Enterotoxin bzw. das natriuretische Hormon verursachte Flüssigkeitssekretion in den Darm. Bei nicht näher definierten Proben mit enterotoxischer Aktivität, etwa ETEC Kulturüberständen kann das Verfahren nicht zwischen den Effekten verschiedener Enterotoxine, z. B. STa und LT, unterscheiden.
- Eine alternative Möglichkeit zur Abschätzung der biologischen Aktivitäten von STh oder

Uroguanylin besteht in der Durchführung von Filtertests, bei denen die Fähigkeit der Peptide zur Bindung an Darmzellen und zur Verdrängung eines radioaktiv markierten STa-Analogons untersucht wird (Garipey *et al.*, 1987). Bei diesem Test wird jedoch lediglich die Bindung an GC-C-exprimierende Zellen, nicht die Aktivierung der GC-C quantifiziert.

- Ein weiterer denkbarer Ansatz besteht darin, die durch STh oder Uroguanylin in GC-C exprimierenden Zellen stimulierte Zunahme der intrazellulären cGMP-Konzentration zu bestimmen (Marx *et al.*, 1998). Geeignete Zelllinien sind z. B. T84 oder Caco2 (Singh *et al.*, 1991; Waldman *et al.*, 1998). Die Quantifizierung von cGMP kann dabei z. B. durch ein immunologisches Verfahren wie ELISA erfolgen (Kap. 3.21.3).

Die zuletzt genannte Methode wurde in dieser Arbeit gewählt um die biologische Aktivität der rekombinant exprimierten GC-C-Agonisten zu untersuchen. Sie ist nicht nur mit relativ geringem Aufwand durchführbar, sondern bietet auch die Möglichkeit, den Effekt auf GC-C direkt zu charakterisieren, da das Produkt der von GC-C katalysierten Reaktion, cGMP, bestimmt wird.

Bei dem durchgeführten Aktivitätstest zeigte sich, sowohl für Uroguanylin als auch für STh, eine von der Konzentration der extrazellulären Peptide abhängige Zunahme der intrazellulären cGMP-Konzentration, was die Aktivität beider rekombinanter Peptide bestätigt (Abb. 4.20). Die gemessene Reaktion der Zellen auf rekombinant hergestelltes STh und chemisch synthetisiertes STh(6-19) liegt in der gleichen Größenordnung. Bei Uroguanylin fällt die cGMP-Konzentrationszunahme jedoch deutlich geringer aus, was vor allem bei den niedrigeren Peptidkonzentrationen erkennbar ist, wo die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten an den Rezeptor die Stärke des cGMP-Signals bestimmen. Ab etwa 500 nM extrazellulärer Peptidkonzentration wird durch alle drei getesteten Peptide eine etwa gleichgroße cGMP-Menge von ca. 25 ng pro Well stimuliert, was für eine maximale Aktivierung der Guanylatzyklase spricht.

Von STh ist bereits bekannt, dass mindestens zwei Disulfidbrücken im korrekten Muster ausgebildet sein müssen, damit das Enterotoxin eine messbare Aktivität aufweist (Garipey *et al.*, 1987). So dient dieses Ergebnis, zusammen mit dem massenspektrometrischen Nachweis der Ausbildung von drei Disulfidbrücken, auch der eindeutigen Bestätigung, dass das rekombinant hergestellte STh die native Disulfidverbrückung aufweist.

Um zu testen, ob STh in der Lage ist, sich *in vitro* selbstständig, also ohne den unterstützenden Einfluss der Prosequenz von Prouroguanylin, zu falten und die nativen Disulfidbrücken auszubilden wurde mit durch DTT reduziertem und anschließend mit GSH/GSSG reoxidiertem STh der gleiche *in vitro* Aktivitätstest durchgeführt (Abb. 4.21). Von Uroguanylin ist bekannt, dass es sich *in vitro* nur mit Hilfe seiner Prosequenz falten kann (Hidaka *et al.*, 1998). Die für die Oxidation

verwendeten Bedingungen, ein Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion von 2 : 1 bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C, führt bei  $\omega$ -Conotoxinen zur Ausbildung der korrekten Disulfidverbrückung mit Ausbeuten von 16 % – 50 % (Price-Carter *et al.*, 1996a). In Abb. 4.21 ist zu erkennen, dass, während reduziertes STh erwartungsgemäß keinerlei biologische Aktivität aufweist, auch das durch Glutathion *in vitro* oxidierte STh nur bei Konzentrationen ab 500 nM zu einer äußerst geringen detektierbaren Produktion von cGMP führt. Die spontane Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken bei der Oxidation *in vitro* erfolgt also nur in vernachlässigbarem Ausmaß. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu der von Batisson *et al.* publizierten Theorie, wonach STh erst nach dem Export aus *E. coli* durch Oxidation mit Luftsauerstoff zu seiner nativen Struktur gelangt (Batisson *et al.*, 2000).

Der Nachweis der biologischen Aktivität des rekombinant exprimierten STh bestätigt nachdrücklich die Eignung der hier entwickelten Strategie, das Propeptid von Uroguanylin als Werkzeug zur Expression auch anderer disulfidverbrückter Peptide zu verwenden. Es hat sich gezeigt, dass das Propeptid auch andere Zielsequenzen tolerieren kann. Ein wesentlicher Vorteil des hier vorgestellten Verfahrens ist die große Reinheit, mit der STh erzielt werden kann (Weiglmeier *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu anderen rekombinanten Verfahren wurden während der gesamten Reinigung keine fehlgefaltete STh-Varianten detektiert (Dwarakanath *et al.*, 1989; Greenberg *et al.*, 1991).

### **5.3 Die von Uroguanylin und STh abgeleiteten Peptide Uroguanylin A3R D6E, Uroguanylin $\Delta_{TIA}$ D6E, STh L9Y und STh Y5R L9Y**

Die strukturellen Voraussetzungen der Bindung zwischen GC-C und den Liganden Guanylin, Uroguanylin und STa (Abb. 1.2) wurden auf Seiten der Peptidliganden durch Mutationsstudien untersucht. Dabei wurde eine Reihe von Sequenzpositionen identifiziert, die einen großen Beitrag bei der Vermittlung der Bindung zu GC-C leisten. Bei STh ist dies vor allem die Asn-12-Pro-13-Ala-14-Sequenz, die als wahrscheinliche Bindungsstelle gilt, da die Substitution von Asn-12 durch Alanin und von Ala-14 durch D-Alanin die Rezeptorbindung des Enterotoxins stark beeinträchtigt (Carpick & Garipey, 1991). Andererseits führt eine Substitution von Pro-13 durch Glycin nur zu einer moderaten Reduktion der Affinität in kompetitiven Bindungsstudien (Waldman & O'Hanley, 1989). Die Asn-12-Pro-13-Ala-14-Sequenz wird auch mit der von STh gezeigten Proteaseresistenz in Verbindung gebracht, da ein Guanylin-Analogon, welches diese Sequenz enthält, eine deutlich höhere Stabilität im Dünndarm von Mäusen aufweist (Carpick & Garipey, 1993). Auch für das Peptidrückgrat von Cys-5-Cys-6-Glu-7-Leu-8 wurde eine Interaktion mit dem Rezeptor

vorausgesagt (Wolfe & Waldman, 2002). Bei Uroguanylin konnte gezeigt werden, dass die Substitution von Asp-3 durch Glutamat zu einer um den Faktor 5 – 8 erhöhten Affinität des Peptids zu GC-C führt (Liu *et al.*, 2009).

Die Tatsache, dass die Prosequenz von Prouroguanylin dazu in der Lage ist, auch die Faltung von STh in seine native Konformation zu unterstützen, zeugt von einer beträchtlichen Toleranz des Prosequenz-vermittelten disulfidgekoppelten Faltungsmechanismus gegenüber der Sequenz des C-terminalen Peptids. Um das Potential dieser neuen Expressionsstrategie zu Herstellung verschiedener von Uroguanylin bzw. STh abgeleiteter disulfidverbrückter Peptide näher zu untersuchen wurden vier Varianten von Prouroguanylin bzw. Prouro-STh entworfen (Abb. 4.22). Bei der Auswahl der in die Konstrukte eingeführten Mutationen dienten Ergebnisse früherer Studien zur Struktur-Aktivitätsbeziehung von STh und Uroguanylin (Waldman & O'Hanley, 1989; Carpick & Gariepy, 1991; Wolfe & Waldman, 2002; Liu *et al.*, 2009) sowie der beiden synthetischen GC-C-Agonisten Linaclotide und Plecanatide als Richtlinien. Zudem wurde versucht, durch das Einführen zusätzlicher Arginin-Reste in die Sequenz die Position der Trypsin-Spaltstellen und damit die Länge der C-terminalen Fragmente zu bestimmen. Wie aus den Ergebnissen der Massenspektrometrie eindeutig hervorgeht (Abb. 4.24), war jedoch die Einführung neuer Trypsin-Spaltstellen sowohl bei den von STh abgeleiteten Peptiden, als auch bei den Uroguanylin-Derivaten erfolglos, da in allen Fällen die C-terminalen Fragmente als 19 Aminosäuren lange Peptide identifiziert wurden, die ggfs. ein zusätzliches Arginin in ihren N-Termini enthielten (Abb. 4.22). Offensichtlich schneidet Trypsin nicht in unmittelbarer N-terminaler Nähe der zweifach oder dreifach disulfidverbrückten Kernregionen, worin sich die bei STh und Uroguanylin nachgewiesene Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau zeigt (Carpick & Gariepy, 1993).

Alle vier neu erstellten Konstrukte konnten in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden und nach dem Verdau mit Trypsin konnten jeweils alle C-terminalen Fragmente durch RP-HPLC isoliert werden (Abb. 4.23). Zudem bestätigten die durch ESI-Massenspektrometrie bestimmten Molekulargewichte, neben der Länge der C-terminalen Fragmente, auch, dass alle in den Peptiden vorhandenen Cysteine oxidiert vorliegen (Abb. 4.24).

STh L9Y sowie STh Y5R L9Y wurden jeweils auch <sup>15</sup>N-markiert gereinigt. Die gemessenen [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-HSQC-Spektren zeigen eine weitgehende Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen der Aminosäuren, die zugeordnet werden können (Abb. 4.25). Da ähnliche chemische Verschiebungen der Resonanzsignale auf eine ähnliche magnetische Umgebung der Amidprotonen schließen lassen, ist dies ein starker Hinweis darauf, dass die Konformation des Peptidrückgrats und damit die Faltung und Disulfidverbrückung der einzelnen Peptide in STh, STh L9Y und STh Y5R L9Y gleich sind. Da in allen drei Peptiden nur jeweils die 7 bzw. 8 C-terminalen

Aminosäuren zugeordnet werden können, während die Punktmutationen von STh in der N-terminalen Hälfte der Peptide lokalisiert sind, führen die Sequenzunterschiede der Peptide bei den beobachtbaren Signalen nicht zu größeren Unterschieden der chemischen Verschiebungen. Diese Beobachtung lässt auch den Schluss zu, dass der Austausch der Aminosäuren zu keiner deutlichen Beeinflussung der Konformation des Peptidrückgrats führt, zumal dieses neben den Disulfidbrücken in erster Linie durch Wasserstoffbrückenbindungen der Rückgratamidgruppen stabilisiert ist, während die Seitenketten der Aminosäuren in der Kristallstruktur von STp nach außen orientiert sind (Ozaki *et al.*, 1991).

Der Nachweis der biologischen Aktivität von STh L9Y und STh Y5R L9Y erfolgte, wie schon bei STh und Uroguanylin, durch die Bestimmung der von den Peptiden in T84-Zellen stimulierten intrazellulären cGMP-Produktion (Abb. 4.26). Beide Peptide sind demnach biologisch aktive Agonisten der GC-C. In Abb. 4.26 fällt auf, dass die Zunahme der cGMP-Menge bei den beiden Peptiden geringer ausfällt als bei STh. STh L9Y bewirkt bei extrazellulären Peptidkonzentrationen von 10 – 100 nM eine deutlich geringere Zunahme der intrazellulären cGMP-Menge als STh. Bei STh Y5R L9Y ist bei Peptidkonzentrationen von 10 nM und 50 nM sogar fast keine Aktivierung der cGMP-Produktion zu detektieren. Gemäß den beim Aktivitätstest bestimmten cGMP-Konzentrationen nimmt die Aktivität der getesteten Peptide in der Reihe STh > STh L9Y > STh Y5R L9Y ab. Dies ist nicht verwunderlich angesichts der Annahme wonach STh als „Superagonist“ der GC-C im Zuge einer konvergenten Evolution entstanden ist und die Sequenz von STh auf maximale Aktivierung der GC-C hin optimiert wurde (Lin *et al.*, 2010b). Offensichtlich führen sowohl die L9Y- als auch die Y5R-Mutation zu einer Verringerung der Aktivität des Enterotoxins. Die L9Y-Mutation ist auch in der Sequenz von Linaclotide vorhanden (Busby *et al.*, 2010). Y5R führt eine positive Ladung in die flexible N-terminale Region des Peptids ein, die seine biologische Aktivität moduliert, obwohl der N-Terminus keine entscheidende Rolle bei der Rezeptorbindung hat (Yoshimura *et al.*, 1985).

Auch die Aktivitäten von Uroguanylin A3R D6E und Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E wurden untersucht. Die Vorläuferproteine Prouroguanylin A72R D75E und Prouroguanylin  $\Delta(70-72)$  D75E unterschieden sich lediglich durch eine Deletion der drei Aminosäuren Thr-70, Ile-71 und Arg-72 in Prouroguanylin  $\Delta(70-72)$  D75E. Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E geht also aus einem Vorläuferprotein hervor, in dem die Linkerregion zwischen Propeptid und Hormonsequenz verkürzt ist. Die C-terminalen Fragmente, die aus beiden Vorläuferproteinen freigesetzt werden, haben aber die gleiche Länge und unterscheiden sich lediglich in der Sequenzposition 2, die bei Uroguanylin A3R D6E von einem Isoleucin und bei Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E von einem Leucin gebildet wird (Abb. 4.22). Abb. 4.27 zeigt, dass Uroguanylin A3R D6E eine mit Uroguanylin vergleichbare biologische Aktivität



aufweist. Im Gegensatz dazu hat Uroguanylin  $\Delta_{TIA}$  D6E fast keinerlei detektierbaren Effekt auf die cGMP-Konzentration im Cytosol der T84-Zellen. Erst bei der größten verwendeten Peptidkonzentration, 1000 nM, ist eine geringe Menge cGMP in den Zelllysaten nachweisbar. Da es nicht wahrscheinlich ist, dass dieser bedeutende Unterschied in der biologischen Aktivität der beiden Uroguanylin-Analoga auf den doch eher geringfügigen Unterschied ihrer Sequenzen zurückzuführen ist, kann aus dem durchgeführten Experiment geschlossen werden, dass eine Verkürzung des C-Terminus der Prosequenz von Prouroguanylin ebenfalls zu einem Verlust ihrer Funktion als intramolekulares Chaperon führt. Im verkürzten Vorläuferprotein kommt es nicht mehr zur Ausbildung der nativen Struktur des C-terminalen Hormons. Die entscheidende Rolle des N-Terminus der Prosequenz bei der Faltung von Uroguanylin wurde bereits gezeigt (Hidaka *et al.*, 2000) aber anhand der Lösungsstruktur von Proguanylin und eines auf dieser Grundlage erstellten Homologiemodells von Prouroguanylin (Abb. 5.1) kann leicht erkannt werden, dass die korrekte Anordnung der Hormonregion im Kontext des Gesamtproteins durch eine Verkürzung des C-Terminus der Prosequenz ebenfalls beeinträchtigt ist (Lauber *et al.*, 2003; Lauber, 2003).

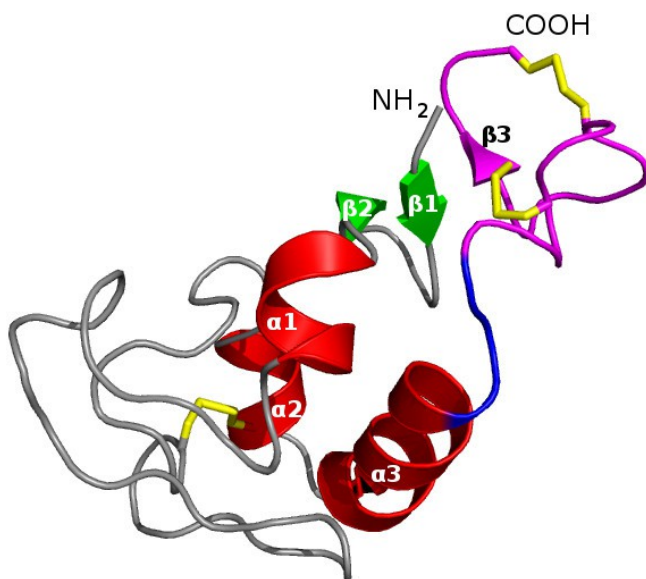


Abb. 5.1: Darstellung eines Strukturmodells von Prouroguanylin (Lauber, 2003). Disulfidbrücken sind gelb dargestellt. Die Hormonregion ist magenta und der Sequenzabschnitt Thr-70-Ile-71-Ala-72, der in Prouroguanylin  $\Delta(70-72)$  D75E deletiert wurde, ist blau hervorgehoben.

Insgesamt folgt aus den durchgeführten Mutationsstudien, dass die Prosequenz von Prouroguanylin das Vorliegen von Punktmutationen an einigen Positionen der C-terminalen Hormon- oder Enterotoxinregion toleriert, dass aber eine Verkürzung des Proteins, und damit eine Änderung der Positionen der zu bildenden Disulfidbrücken innerhalb der Sequenz, zu einer Fehlfaltung des C-Terminus führt.

#### 5.4 Vergleich der Ausbeuten bei der Herstellung der verschiedenen GC-C-Agonisten

Ein Vergleich der Ausbeuten, die bei der Reinigung der einzelnen Liganden von GC-C erzielt wurden, zeigt deutliche Unterschiede (Tab. 5.1) sowohl zwischen den einzelnen Peptiden als auch was die Wahl des verwendeten Mediums für die Bakterienanzucht betrifft. Dabei führt die Expression in  $^{15}\text{N}$ -markiertem Minimalmedium erwartungsgemäß zu deutlich geringeren Ausbeuten als in LB-Vollmedium, was auf die schlechteren Wachstumsbedingungen zurückzuführen ist. Von allen exprimierten Konstrukten kann Prouroguanylin mit der höchsten Ausbeute gerreinigt werden. Es hat sich während der Reinigung gezeigt, das Prouro-STh deutlich schlechter löslich ist als Prouroguanylin, was auch zu den geringeren Ausbeuten bei der Reinigung beigetragen hat. Die äußerst schlechte Ausbeute, mit der STh Y5R L9Y hergestellt werden kann, ist vor allem auf das Elutionsverhalten des Peptids bei der RP-HPLC zurückzuführen. Unter den gewählten Bedingungen konnte der Elutionsgipfel von STh Y5R L9Y nicht komplett von anderen eluierten Peptiden getrennt werden (Abb. 4.23). Um möglichst reines STh Y5R L9Y zu erhalten wurde deshalb nur ein Teil des eluierten Peptids auch gesammelt und für weitere Analysen verwendet.

Insgesamt zeigen die in Tab. 1 aufgeführten Daten jedoch, dass die rekombinante Herstellung von Agonisten der GC-C eine interessante Alternative zu deren chemischer Synthese sein kann, da bei den hier im Labormaßstab durchgeführten Versuchen, mit Kulturvolumina von zumeist 4 L, durchaus Peptidmengen im dreistelligen  $\mu\text{g}$ -Bereich erzielt werden können. Die hier vorgestellte rekombinante Herstellungsstrategie sollte sich relativ einfach auf größere Produktionsmengen übertragen lassen.

*Tab. 5.1: Ausbeuten der rekombinanten Expression von GC-C-Agonisten. Die gereinigten Mengen sind jeweils für das Vorläuferprotein sowie den freien Liganden in Milligramm pro Liter Bakterienkultur angegeben.*

Peptid	Medium d. Zellanzucht	Vorläuferprotein: mg / L Kultur	Produkt: mg / L Kultur
Uroguanylin	LB, unmarkiert	3,53	0,330
	M9, $^{15}\text{N}$ -markiert	2,75	0,170
STh	LB, unmarkiert	2,93	0,325
	M9, $^{15}\text{N}$ -markiert	2,25	0,290
STh L9Y	M9, $^{15}\text{N}$ -markiert	1,30	0,140
STh Y5R L9Y	M9, $^{15}\text{N}$ -markiert	1,40	0,003
Uroguanylin A3R D6E	LB, unmarkiert	1,13	0,070
Uroguanylin $\Delta_{\text{TIA}}$ D6E	LB, unmarkiert	0,78	0,025

### 5.5 Reinigung und Charakterisierung von MiniGC-C

Ein auf der Basis der bereits bekannten Kristallstruktur der homologen Rezeptordomäne von GC-A erstelltes Strukturmodell der ECD von GC-C lässt eine Unterteilung der Domäne in eine membranferne  $\alpha/\beta$ -reiche Subdomäne und eine membran-nahe  $\beta$ -faltblattreiche Subdomäne zu (Hasegawa *et al.*, 2005). Da in Letzterer auch die wahrscheinliche Ligandenbindungsstelle von GC-C lokalisiert ist (Wada *et al.*, 1996; Hasegawa *et al.*, 1999a) stellt sich die Frage ob diese Subdomäne allein alle strukturellen Voraussetzungen für die Ligandenbindung aufweist (Abb. 5.2).

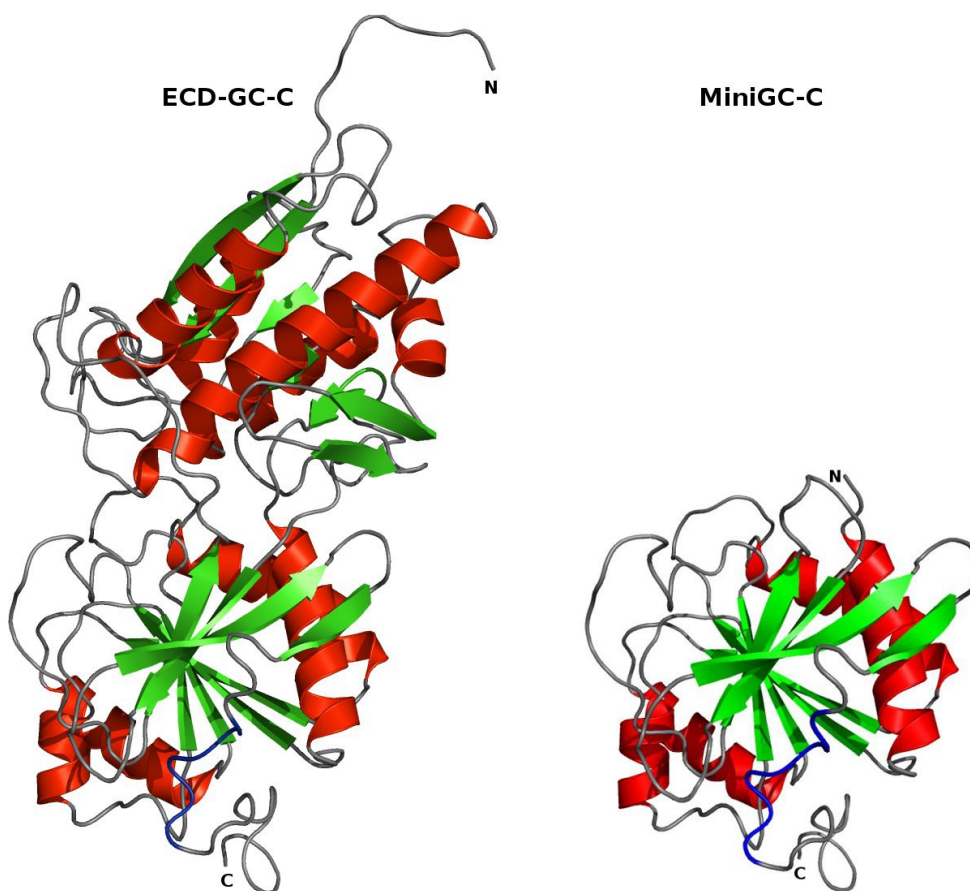


Abb. 5.2: Strukturmodelle von ECD-GC-C und MiniGC-C (Lauber *et al.*, 2009). Helikale Elemente sind rot,  $\beta$ -Faltblätter grün dargestellt. Die postulierte Ligandenbindungsstelle ist blau markiert (Hasegawa *et al.*, 1999).

Mit MiniGC-C wurde durch rationales Design ein Protein entwickelt, welches die Eigenschaften der in der ECD von GC-C vermeintlich identifizierten membranproximalen Subdomäne, inklusive der möglichen Ligandenbindung, auf sich vereinen und dazu noch, durch seine geringere Größe, für NMR-Studien leichter zugänglich sein sollte (Lauber *et al.*, 2009). In einer früheren Studie wurde

das porcine, als von GC-C aus Schweinen abgeleitete, MiniGC-C als lösliches und gefaltetes Protein gereinigt. Durch Fluoreszenzemissionsspektroskopie wurde eine Bindung dieses Proteins an das hitzestabile Enterotoxin STp(5-17) gefunden (Tidten, 2003; Lauber *et al.*, 2009). Die unabhängige Faltung der membranproximalen Subdomäne konnte bereits bei der ECD des homologen humanen Rezeptors GC-B gezeigt werden, wo allerdings keine Bindung des Liganden CNP durch die Subdomäne erfolgt (Knake *et al.*, 2009).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das humane MiniGC-C exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Da MiniGC-C eine Disulfidbrücke besitzt, erfolgte die Expression des Proteins ebenfalls in Origami B (DE3). Als Fusionsprotein mit dem Löslichkeitsanhang NusA konnte MiniGC-C stark exprimiert werden (Abb. 4.28). Die Reinigung erfolgte mittels Nickelionenaffinitäts- und Anionenaustauschchromatographie und führte zu einer sehr sauberen Probe des Proteins (Abb. 4.30). Das durch Größenausschlusschromatographie ermittelte Molekulargewicht von MiniGC-C von 21,8 kDa stimmt gut mit dem rechnerischen Wert von 22,8 kDa überein (Abb. 4.31), woraus abgeleitet werden kann, dass MiniGC-C in Lösung nicht oligomer vorliegt, wie dies für die gesamte extrazelluläre Domäne beschrieben wurde (Hirayama *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 1999c). Falls also die ECD von GC-C ein eigenes Oligomeresierungsmotiv besitzt, so liegt dieses wohl nicht innerhalb der membranproximalen Subdomäne. Bei der Bestimmung des Molekulargewichts durch Größenausschlusschromatographie wird vorausgesetzt, dass das untersuchte Protein eine globuläre Struktur aufweist, eine Annahme die angesichts des Homologiemodells von GC-C (Abb. 1.6) als gerechtfertigt erscheint.

Die Untersuchung von MiniGC-C mittels CD-Spektroskopie im Fern-UV-Bereich offenbarte Unterschiede in der Sekundärstruktur von MiniGC-C zu den aus der Aminosäuresequenz vorhergesagten und aus dem Strukturmodell abgeleiteten Anteilen an Sekundärstrukturelementen. Das gemessene Fern-UV-CD-Spektrum (Abb. 4.32) zeigt eindeutig, dass das Protein gefaltet ist aber die Analyse des Spektrums durch den CDSSTR-Algorithmus (Johnson, 1999) ergab einen Anteil an  $\alpha$ -Helices von 13 % und einen Anteil an  $\beta$ -Strängen von 31 %. Das für MiniGC-C aufgestellte Strukturmodell (Abb. 1.6) enthält 25 %  $\alpha$ -Helices und 24 %  $\beta$ -Faltblätter. Damit wird deutlich, dass sich die Sekundärstruktur von MiniGC-C deutlich von der Vorhersage aus dem Homologiemodell unterscheidet. Insbesondere der Anteil an  $\alpha$ -Helices ist mit 13 % überraschend gering.

Auch das [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum von MiniGC-C (Abb. 4.33) deutet darauf hin, dass dieses gefaltet ist, da die Dispersion der Protonenresonanzsignale über einen Frequenzbereich von 4,4 ppm nur durch eine ausgeprägte Tertiärstruktur zu erklären ist. Im Gegensatz dazu zeichnen sich ungefaltete Proteine dadurch aus, dass ihre Amidprotonen auf den Frequenzbereich von etwa 7,5 –

8,9 ppm beschränkt sind. Im Spektrum von MiniGC-C sind nur etwa zwei Drittel der zu erwartenden Amidprotonenresonanzsignale detektierbar. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass innerhalb des Proteins Austauschprozesse zwischen zwei oder mehreren konformationellen Zuständen vorliegen, die auf einer sog. intermediären Zeitskala, also im  $\mu$ s-ms-Bereich, stattfinden. Die Resonanzsignale der beteiligten etwa 60 Aminosäuren sind aufgrund einer starken Linienverbreiterung nicht detektierbar, ähnlich wie dies auch für einige Aminosäuren von STh der Fall ist (siehe Kap. 4.2.6). Es ist schwierig, eine Aussage über die Art des Austauschprozesses oder der beteiligten konformationellen Grenzstrukturen zu treffen. Möglicherweise handelt es sich um ein teilweises Entfalten und Rückfalten des Proteins, das in der Abwesenheit der membrandistalen Subdomäne begünstigt wird. Oder es handelt sich um eine native Eigenschaft des Proteins, die auch im Kontext der gesamten ECD vorliegt.

Um die Frage zu klären, ob MiniGC-C in der Lage ist, die Liganden der GC-C zu binden, wurde das  $^{15}\text{N}$ -markierte Protein mit den unmarkierten Liganden Uroguanylin und STh titriert und deren Effekt auf das HSQC-Spektrum von MiniGC-C verfolgt (Abb. 4.34 A, 4.35 A). Im Falle einer Bindung wäre aufgrund der sich ändernden chemischen und magnetischen Umgebung der Aminosäuren von MiniGC-C, die in der Nähe der Bindungsstelle liegen, eine Veränderung ihrer chemischen Verschiebung zu erwarten. Bei den durchgeführten Titrations zeigt sich jedoch für keinen der beiden Liganden ein erkennbarer Effekt auf das Spektrum von MiniGC-C, weder eine Verlagerung der Positionen der Resonanzen noch das Auftauchen neuer Signale. Da es jedoch vorstellbar war, dass von der Bindung an Uroguanylin bzw. STh lediglich die Aminosäuren betroffen sind, welche im Spektrum von MiniGC-C nicht detektiert werden können, waren diese Experimente allein nicht ausreichend um eine Ligandenbindung von MiniGC-C ausschließen zu können. Hier zeigt sich der immense Nutzen der im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelten rekombinanten Herstellung von GC-C-Liganden, da sie die  $^{15}\text{N}$ -markierten Liganden leicht zugänglich macht und somit auch die Titrations unter Beobachtung der Effekte von MiniGC-C auf die  $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren von Uroguanylin und STh, durchgeführt werden können (Abb. 4.34 B, 4.35 B). Aufgrund der geringen Größe der Peptidliganden ist anzunehmen, dass eine Bindung an das wesentlich größere MiniGC-C in jedem Fall an den Resonanzsignalen der Liganden erkennbar ist. Es hat sich jedoch wiederum gezeigt, dass die Zugabe von MiniGC-C zu keiner Veränderung der NMR-Spektren von Uroguanylin und STh führt. Damit kann eine Wechselwirkung zwischen den Peptiden und MiniGC-C ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der für porzines MiniGC-C publizierten Bindung von STp (Lauber *et al.*, 2009). Bei den mit porzinem MiniGC-C durchgeführten Experimenten (Tidten, 2003) fällt jedoch auf, dass die Ligandenbindung ausschließlich durch fluoreszenzspektroskopisch, nicht aber mittels

Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte. Bei der durchgeführten Fluoreszenztitration lagen die Anregungswellenlänge bei 295 nm und die Detektionswellenlänge bei 328 nm, womit unter den Bedingungen des Experiments in erster Linie das Ramansignal des Wassers gemessen worden wäre, typischerweise aber nicht die Fluoreszenz von Tryptophanen. Dies spricht dafür, dass die für porzines MiniGC-C gemessenen Daten fälschlich als Nachweis einer Ligandenbindung interpretiert worden sein könnten.

Als Erklärung dafür, dass keine Wechselwirkung zwischen MiniGC-C und den Liganden der GC-C nachgewiesen werden konnte, kommen vielfältige Gründe in Frage. Möglicherweise ist die membrandistale Subdomäne doch in einer Weise, die bisher nicht erkannt wurde, an der Ligandenbindung beteiligt. Oder aber es vollzieht sich die Faltung der membranproximalen Subdomäne ohne die anderen Teile des Proteins nicht vollständig, was zu einer Beeinträchtigung einer möglichen Ligandenbindung führen könnte. Eventuell reicht auch die Sequenzhomologie zwischen GC-A und GC-C nicht aus um ein verlässliches Strukturmodell von GC-C aufzustellen, welches die beim Design von MiniGC-C angewendete Strategie rechtfertigt. Die Sequenzidentität der extrazellulären Domänen beider Guanylatzyklasen liegt bei nur 19 %.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in einem nächsten Schritt die Expression der gesamten ECD von GC-C in *E. coli* unternommen um zu testen ob dadurch ein Bindungspartner für Uroguanylin und STh gewonnen werden kann.

## 5.6 Expression der gesamten ECD von GC-C in *E. coli*

Die Expression von GC-C oder ihrer Rezeptordomäne in Säugerzellen führt zu Proteinen, die die Fähigkeit zur Ligandenbindung haben, aber nur in geringen Mengen exprimiert werden und nur schwer gereinigt werden können (Schulz *et al.*, 1990; Hirayama *et al.*, 1993). Die gesamte extrazelluläre Domäne von GC-C kann in Insektenzellen als lösliches Glykoprotein exprimiert werden, welches zum Liganden STp(4-17) eine ähnliche Affinität hat wie das Gesamtprotein (Hasegawa *et al.*, 1999c). Die ECD wurde auch in *E. coli* exprimiert, um damit anschließend Antikörper gegen GC-C zu produzieren. Die Autoren dieser Studien berichten, dass die auf diese Weise hergestellte Domäne die Fähigkeit zur Bindung von STh behält (Nandi *et al.*, 1996). Die Expression der gesamten ECD von GC-C in *E. coli* schien aufgrund dieser Daten ein guter Weg zur Herstellung eines GC-C-Fragments zu sein, welches in genügender Menge und Reinheit zugänglich sein sollte, um die Ligandenbindung von GC-C auf molekularer Ebene zu studieren. Mit einem bakteriellen Expressionssystem können zumeist deutlich höhere Ausbeuten an rekombinantem

Protein erzielt werden als dies mit eukaryotischen Systemen der Fall ist. Außerdem erlaubt die Expression in *E. coli* oft eine einfache und kostengünstige Markierung des Zielproteins mit NMR-aktiven Isotopen.

Für die Expression und Reinigung der ECD von GC-C aus *E. coli* wurde eine Strategie gewählt, die dem bei MiniGC-C verwendeten Vorgehen sehr ähnlich ist. Aufgrund der im Protein vorliegenden vier Disulfidbrücken (Hasegawa *et al.*, 2005) wurde die Expression des Proteins in Origami B (DE3) durchgeführt. Es wurden zwei Konstrukte getestet, die sich in ihren Löslichkeitsanhängen unterscheiden: pET32a-ECD-GC-C kodiert für einen N-terminalen Trx-Anhang während pET43.1a-NusA-ECD-GC-C für den bekannten N-terminalen NusA-Anhang kodiert. Beide Fusionsproteine enthalten einen Hexahistidin-Anhang, der ihre Reinigung durch Metallionen-Affinitätschromatographie ermöglichen soll. Keines der getesteten Konstrukte erlaubt eine Produktion der ECD als lösliches Protein in genügender Reinheit. Das Trx-ECD-GC-C-Fusionsprotein ist in großen Teilen unlöslich und kann nach der Lyse nur durch 8 M Harnstoff teilweise in Lösung gebracht werden (Abb. 4.37 B). Da die Rückfaltung mit dem Verlust von großen Mengen des löslichen Proteins einhergeht und das übrige Protein im Verlauf der folgenden Nickelionen-Affinitätschromatographie fast vollständig ausfällt ist anzunehmen, dass die ECD in diesem Konstrukt nicht die native, lösliche Faltung annimmt. Das NusA-ECD-GC-C-Fusionsprotein ist über einen längeren Zeitraum hinweg löslich und bindet an die Nickelsäule (Abb. 4.37 C u. D). Allerdings kann das 104 kDa Fusionsprotein nicht von zwei kleineren Proteinen getrennt werden, welche Molekulargewichte von etwa 66 und 75 kDa besitzen. Möglicherweise handelt es sich bei diesen um kleinere Fragmente des Fusionsproteins, welche durch proteolytischen Verdau von NusA-ECD-GC-C entstehen. Außerdem verläuft die Abspaltung des NusA-Anhangs nicht vollständig und führt zu einer Probe, in der noch größtenteils das ungespaltene Fusionsprotein sowie ein Protein von etwa 66 kDa vorliegt (Abb. 4.38). Diese beiden Proteine konnten erst durch Größenausschlusschromatographie voneinander getrennt werden (Abb. 4.39). Bei der Größenausschlusschromatographie zeigte sich, dass das Fusionsprotein NusA-ECD-GC-C nicht die erwartete Größe eines 104 kDa Proteins hat, sondern im Totvolumen der Säule zusammen mit dem polymeren Farbstoff Blue Dextran eluiert. Dies lässt auf eine Oligomersierung des Proteins schließen und könnte auch eine Erklärung für die Beobachtung sein, dass sich das Fusionsprotein kaum mit PreScission-Protease spalten lässt. Da für die native ECD von GC-C eine Oligomerisierung vorgeschlagen wurde, die unabhängig von der intrazellulären Dimersierungsdomäne zustandekommt (Hirayama *et al.*, 1993), und andererseits auch eine auf der Fehlfaltung des Proteins beruhende Oligomerisierung des Proteins durch intermolekulare Disulfidbrückenbildung vorstellbar war, wurde das Verhalten des Proteins bei der SDS-PAGE unter

reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht (Abb. 4.40). Dabei zeigte sich, dass NusA-ECD-GC-C unter nicht-reduzierenden Bedingungen nicht oder nur in geringem Umfang in das Gel eindringen kann, während es unter reduzierenden Bedingungen auf der für ein 104 kDa Protein erwarteten Position läuft. Dieses Ergebnis deutet auf eine Bildung von Oligomeren des Fusionsproteins hin, welche durch intermolekulare Disulfidbrücken stabilisiert sind. Dieses Verhalten unterscheidet die ECD von GC-C von dem unter ähnlichen Bedingungen exprimierten MiniGC-C (siehe Kap. 4.4.1.3). Zwar ist damit eine Fehlfaltung des Proteins unter den gewählten Expressionsbedingungen wahrscheinlich, um aber dennoch zu testen, ob das exprimierte Fusionsprotein in der Lage ist, den Liganden Uroguanylin zu binden wurde eine NMR-Titration durchgeführt (Abb. 4.41). Das [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Uroguanylin ändert sich, wie zu erwarten war, nicht bei Zugabe von NusA-ECD-GC-C, womit ausgeschlossen werden kann, dass das in *E. coli* exprimierte und gereinigte Protein die nativen Ligandenbindungseigenschaften von GC-C besitzt.

Im Rahmen von einigen Bachelor- und Masterarbeiten, die am Lehrstuhl durchgeführt wurden, konnten noch eine Reihe von anderen Konstrukten auf ihre Eignung zur rekombinanten Expression der ECD in *E. coli* untersucht werden:

- pET43.1a-NusA-ECD-GC-C, welches das wildtypische NusA als Löslichkeitsanhang verwendet (Weirich, 2009)
- pET15b-ECD-GC-C, welches für ein Fusionsprotein aus der ECD von GC-C und lediglich einem Hexahistidin-Anhang kodiert und in *E. coli* Origami B (DE3) exprimiert wurde (Best, 2010)
- ein pPET43.1a-NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C Konstrukt wurde auch in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert (Best, 2010)
- pMal-p5x-hu-ECD-GC-C kodiert für eine Fusion aus dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) und der ECD von GC-C und besitzt ein Signalsequenz für die sekretierte Expression des Proteins durch *E. coli* BL21 (Fischer, 2010)

Mit keinem dieser Ansätze gelang die Reinigung des nativ gefalteten Zielproteins. In allen Fällen wurden Hinweise auf die Fehlfaltung des Proteins gefunden oder das exprimierte Fusionsprotein hat sich als äußerst anfällig für proteolytischen Abbau erwiesen.

Als möglicher Grund dafür, dass sich *E. coli* offensichtlich nicht als Expressionssystem für die ECD von GC-C eignet, kommt das Fehlen von posttranslationalen Modifikationen, insbesondere von



Glykosylierungen, in Frage. GC-C wird in Säugerzellen als Glykoprotein exprimiert (Schulz *et al.*, 1990; Vaandrager *et al.*, 1993) jedoch ist die Rolle der Saccharidreste für die Funktion der Rezeptordomäne umstritten. Während einige Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Glykosylierungen essentiell für die Bindung der Liganden sind (Hasegawa *et al.*, 1999c) deuten andere Studien darauf hin, dass die Glykosylierungen dazu dienen, die Faltung der extrazellulären Domäne in die native Konformation zu ermöglichen ohne selbst an der Ligandenbindung beteiligt zu sein (Hasegawa *et al.*, 1999b; Ghanekar *et al.*, 2004). Ein anderer Grund für die beobachtete Fehlfaltung der ECD ist möglicherweise das Fehlen einer für das humane Protein geeigneten Faltungsmaschinerie in *E. coli*. Möglicherweise sind spezielle eukaryotische Chaperone nötig um die ECD von GC-C zu falten, oder aber die korrekte Faltung des Membranproteins ist abhängig von einem eukaryotischen Sekretionssystem und vollzieht sich parallel zum Export ins extrazelluläre Medium. Da ein solcher Sekretionsapparat, bestehend aus endoplasmatischem Reticulum und Golgi-Apparat, in *E. coli* nicht vorhanden ist, kann sich möglicherweise die native Konformation der Rezeptordomäne nicht ausbilden.

Um die Einschränkungen des bakteriellen Expressionssystems zu überwinden wurde die Expression der ECD schließlich in der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* unternommen.

### 5.7 Expression der ECD von GC-C in *P. pastoris*

*P. pastoris* ist ein seit einigen Jahren gut etabliertes Expressionssystem für die heterologe Produktion von Proteinen (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Daly & Hearn, 2005). Für viele Proteine unterschiedlichen Ursprungs, darunter auch einige menschliche Membranproteine, konnten Expressionsstrategien in *P. pastoris* etabliert werden (Cereghino & Cregg, 2000). Die Ausbeuten an rekombinantem Protein sind dabei oft, für ein eukaryotisches Expressionssystem, außerordentlich hoch und erreichen Werte von 300 – 400 mg Protein pro Liter Kultur (Masuda *et al.*, 2005; Kuwae *et al.*, 2005). Unter den erfolgreich in *P. pastoris* exprimierten Proteinen sind z. B. auch Fragmente der intrazellulären Region der zu GC-C homologen Rezeptorguanylatzyklase B (Solov'eva *et al.*, 2000). Die Hefezellen lassen sich genetisch einfach manipulieren, wachsen auf definierten Minimalmedien und können in Fermenterkulturen hohe Zelldichten erreichen, was zur Expression großer Mengen an rekombinanten Protein führen kann (Cereghino *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2009). Außerdem ist *P. pastoris* dazu in der Lage, viele Proteinmodifikationen höherer Eukaryonten, wie etwa Glykosylierungen, Disulfidbrückenbildung und proteolytische Prozessierung, durchzuführen. Schließlich eignet sich *P. pastoris* gut zur Isotopenmarkierung von

rekombinanten Proteinen (Morgan *et al.*, 1999; Rodriguez & Krishna, 2001; Yao *et al.*, 2002; Takahashi & Shimada, 2010). Die Hefezellen tolerieren selbst das für Zellen vieler höherer Eukaryonten toxische D<sub>2</sub>O, was die Deuterierung von Proteinen erlaubt (Morgan *et al.*, 2000).

Da für die Anzucht der Zellen und die Expression der ECD durch Fermentation geeignete Klone identifiziert werden mussten, welche das Zielprotein mit möglichst hoher Ausbeute produzieren, wurden die mit pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis transformierten Zellen auf Medium mit hohen Konzentrationen des Aminoglykosid-Antibiotikums Geneticin (G-418) ausplattiert. Geneticin hemmt die eukaryotische Proteinbiosynthese und eignet sich deshalb zur Selektion von Zellen, die mehrere Kopien des Expressionsplasmids in ihrem Chromosom enthalten und deswegen aufgrund des Gen-Dosis-Effekts selbst gegenüber hohen Konzentrationen des Antibiotikums resistent sind. Die tatsächliche Expression des Zielproteins durch die Geneticin-resistenten Klone wurde durch Expressionstests in Schüttelkulturen überprüft und der Klon, der die höchste Expression zeigte, wurde anschließend für die Fermentation mit einem Startvolumen von 5 l Medium verwendet.

Bei einem Vergleich der Westernblots, die zur Überprüfung der Proteinexpression in den Schüttelkulturen und bei der Fermentation durchgeführt wurden, fällt auf, dass die detektierten Banden deutlich unterschiedliche Laufhöhen aufweisen (Abb. 4.43 B, Abb. 4.45 B). Während bei den Expressionstests im Schüttelkolben eine Bande bei etwa 45 kDa identifiziert wird, enthält der Westernblot der Fermentation Banden bei 60 kDa, 90 kDa und 180 kDa, wobei die 90 kDa-Bande am intensivsten ist. Die Detektion erfolgte jeweils mit einem polyklonalen Antikörper, der den C-terminalen Hexahistidin-Anhang des Zielproteins spezifisch erkennt. Warum sich die detektierten Bandenmuster bei beiden Expressionen so deutlich voneinander unterscheiden ist nicht bekannt. Möglicherweise führen die unterschiedlichen Expressionsbedingungen dazu, dass die produzierten und sekretierten Proteine unterschiedlich glykosyliert werden. Ein Einfluss von Wachstumsbedingungen auf die Glykosylierung von rekombinanten Proteinen wurde für *P. pastoris* schon früher beobachtet (Schenk *et al.*, 2008). Die Banden des Expressionstests liegen mit etwa 45 kDa nahe am theoretischen Molekulargewicht der nicht-glykosylierten ECD (47, 2 kDa), so dass spekuliert werden kann, dass unter den Bedingungen des Expressionstests keine Glykosylierung des Zielproteins erfolgt. Die Proteine, die in den Überständen der Fermentation detektiert werden können, repräsentieren möglicherweise die glykosylierte Formen der ECD, wobei der Hauptteil als 90 kDa schweres Protein vorliegt. Es muss darauf hingewiesen werden, dass sich die Glykosylierungsmuster von in *P. pastoris* exprimierten Proteinen und Proteinen, die in Säugerzellen exprimiert wurden, voneinander unterscheiden können (Verwecken *et al.*, 2007).

Zwar war in den Überständen der während der Fermentation gezogenen Proben eindeutig ein Protein mit Hexahistidin-Anhang detektierbar (Abb. 4.45 B), jedoch konnte dieses binnen weniger

Stunden nach der Fermentation nicht mehr nachgewiesen werden. Der Überstand wurde nach dem Ende der Kultivierung auf eine HisTrap<sup>TM</sup>-Säule aufgetragen, ein Vorgang, der mehrere Stunden in Anspruch nahm, jedoch konnte kein Protein spezifisch an die Nickelsäule gebunden werden. Dies lässt auf eine geringe Stabilität des Proteins gegenüber von Proteasen, die sich im Medium befinden, schließen. Zwar ist es möglich, dass lediglich der C-terminale Hexahistidin-Anhang abgespalten wird, wodurch die Detektion unmöglich gemacht wird. Allerdings haben schon frühere Versuche, die ECD rekombinant zu exprimieren, gezeigt, dass diese insgesamt empfindlich gegenüber proteolytischem Abbau ist (Fischer, 2010).

Unter den Wachstumsbedingungen der Fermentation kommt es zu einer Lyse eines kleinen Teils der kultivierten Hefezellen, wodurch eigentlich intrazelluläre Proteasen ins Medium gelangen können (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Es wurden eine Reihe von Maßnahmen getroffen, um Proteasen während der Expression zu inhibieren. So sollte die Verwendung von Pepton und Caseinhydrolysat im Medium die Aktivität von Proteasen kompetitiv hemmen (Daly & Hearn, 2005). Auch durch die Senkung des pH-Werts des Kulturmediums kann Proteolyse von sekretierten Proteinen reduziert werden (Cregg *et al.*, 1993). *P. pastoris* kann über einen breiten pH-Bereich (3,0 – 7,0) wachsen (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Während der Fermentation hatte das Kulturmedium einen pH von 6,0 und dieser wurde durch regelmäßige Zugabe von Ammoniak auf diesem Wert gehalten. Da der pI der ECD bei 5,5 liegt gibt es jedoch keinen Spielraum für eine weitere Absenkung des pH-Werts des Mediums.

## 5.8 Expression der ECD von GC-C in Säugerzellen

Neben *P. pastoris* wurde noch ein weiteres eukaryotisches Wirtssystem auf seine Eignung zur Expression der ECD getestet. Die Wahl fiel auf Säugerzellen, da diese erfolgreich zur Expression der extrazellulären Domäne des homologen Rezeptors GC-A eingesetzt wurden (Misono *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2003). Die Expression des GC-A Fragments in COS-1 und CHO (*engl. chinese hamster ovary*) resultierte jedoch nur in relativ geringen Ausbeuten von 0,1 – 0,5 mg Protein pro Liter Zellkultur (Misono *et al.*, 1999). Ein glykosyliertes Fragment von GC-C, bestehend aus der extrazellulären Domäne, der transmembranen Domäne und einem Teil der Kinase-homologen Domäne, wurde in COS-7 Zellen exprimiert und war in der Lage, STh zubinden, jedoch wurde dieses Protein nicht aus den Zellmembranen der COS-7 Zellen isoliert (Hirayama *et al.*, 1993).

Der gewählte Expressionsvektor wurde schon erfolgreich zur Expression des synaptischen Membranproteins Neurexin 1 $\beta$  eingesetzt (Ushkaryov *et al.*, 1994; Reissner *et al.*, 2008). Er kodiert

für eine genetische Fusion aus dem Zielprotein und der Fc-Domäne von humanem IgG, die transient exprimiert und ins Kulturmedium sekretiert wird. Die IgG-Fusion wurde gewählt, da sie eine einfache Möglichkeit der hochaffinen Reinigung des Zielproteins verspricht. Zur Expression des Plasmids pCMV\_Nrxn\_ECD-GC-C-Thr standen die beiden Zelllinien COS-7 und HEK 293T zur Verfügung, die von Nierengewebe abgeleitet sind. In ersten Expressionsversuchen hat sich gezeigt, dass HEK 293T Zellen bei transienter Transfektion wesentlich größere Mengen an rekombinantem Protein sekretieren (Abb. 4.46) und sich deshalb besser für die Expression möglichst großer Mengen an Protein eignen. Das rekombinante Fusionsprotein erscheint im SDS-Gel als starke Bande bei einem beobachtbaren Molekulargewicht von etwa 230 – 250 kDa. Dabei handelt es sich jedoch um eine dimere Form, da Kontrollen zeigen, dass der IgG-Anhang eine unter den Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese beständige Dimerisierung vermittelt (Abb. 4.47 A). Unter Berücksichtigung des Molekulargewichts von IgG (26,8 kDa) ergibt sich für die monomere ECD ein Molekulargewicht von 90 – 100 kDa, was im Einklang mit der zu erwartenden umfangreichen Glykosylierung des Proteins steht.

Weiterhin fällt auf, dass auch nach der Reinigung mit Protein A Beads neben der starken Produktbanden eine Vielzahl von Banden erkennbar sind, die bei kleineren Molekulargewichten detektiert werden (Abb. 4.46). Dabei kann es sich um Wirtsproteine, aber auch um Abbauprodukte, handeln. Der Umstand, dass in den Überständen von Kontrollzellen, die mit pCMV\_Nrxn oder keinem Plasmid transfiziert wurden (Abb. 4.47 A, Bahnen 2, 3, 6 und 7), wesentlich weniger Verunreinigungen sichtbar sind als in Überständen von mit pCMV\_Nrxn\_ECD-GC-C-Thr transfizierten Zellen (Abb. 4.47 A, Bahnen 4 und 5) ist jedoch ein deutlicher Hinweis, dass es sich bei einem größeren Teil der sichtbaren Banden um Fragmente des exprimierten Fusionsproteins handelt.

In einem nächsten Schritt sollte der Einfluss der Glykosylierung auf die Expression der Konstrukte bestimmt werden. Tunicamycin ist ein Gemisch verschiedener homologer Nukleosid-Antibiotika, die bei Eukaryonten das Enzym N-Acetyl-Glukosamin-Phosphotransferase inhibieren (Tkacz & Lampen, 1975). Da dieses Enzym den ersten Schritt der Synthese von N-Glykanen katalysieren führt Tunicamycin in eukaryotischen Zellen dazu, dass die N-Glykosylierung von Proteinen unterdrückt wird. Eine Reihe von Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die N-Glykosylierung von GC-C zwar keine direkte Rolle bei der Ligandenbindung durch das Protein spielt, aber entscheidend für die Ausbildung seiner korrekten Konformation sowie seiner Stabilisierung ist (Hasegawa *et al.*, 1999b; Ghanekar *et al.*, 2004). Deswegen wurde untersucht, welchen Einfluss Tunicamycin auf die Expression der extrazellulären Domäne von GC-C in HEK 293T hat (Abb. 4.47 B). Während die Expression von isoliertem IgG nicht von Tunicamycin beeinträchtigt wird (Abb. 4.47 B, Bahnen 9

und 10), ist in den Kulturüberständen der mit pCMV\_Nrxn\_ECD-GC-C-Thr transfizierten Zellen in Gegenwart von Tunicamycin kein sekretiertes Fusionsprotein detektierbar (Abb. 4.47 B, Bahn 12). Im Zelllysatsat ist eine sehr schwache Bande erkennbar, die einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa entspricht (Abb. 4.47 B, Bahn 13). Dabei handelt es sich möglicherweise um das nicht glykosylierte Fusionsprotein, das nicht exportiert wird und im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert (Ghanekar *et al.*, 2004). Die insgesamt aber nur sehr schwachen Banden legen nahe, dass das Zielprotein ohne Glykosylierung schnell abgebaut wird.

Wie schon bei der Expression in *P. pastoris* besteht auch bei der aus HEK 293T isolierten ECD das große Problem der mangelnden Stabilität des gereinigten Proteins. Dieses war unmittelbar nach der Expression noch sehr deutlich detektierbar, konnte jedoch nach der erfolgten Thrombin-Spaltung nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.48). Thrombin gilt als sehr spezifische Protease, jedoch wurde der unspezifische Abbau von rekombinant hergestellten Proteinen durch Thrombin schon beobachtet (Rajalingam *et al.*, 2008). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das rekombinante ECD-GC-C von Wirtspoteasen, die entweder in den Kulturüberstand sekretiert oder durch Zelllyse dorthin freigesetzt und bei der Isolierung des Fusionsproteins mitgeschleppt werden.

## 5.9 Schlussbemerkung

Seit der Identifizierung von GC-C als Rezeptor des hitzestabilen Enterotoxins STh ist die Aufklärung der molekularen Basis der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung und der Konformationsänderung, die das Signal von der extrazellulären Rezeptordomäne zur intrazellulären katalytischen Domäne weiterleitet, Ziel intensiver Forschungsanstrengungen (Schulz *et al.*, 1990). Eine Charakterisierung der Ligandenbindung durch GC-C mit atomarer Auflösung, wie es durch biophysikalische Techniken möglich ist, macht es erforderlich, beide Bindungspartner in großer Reinheit und genügender Menge herstellen zu können.

In dieser Arbeit wurde versucht, die Rezeptordomäne von GC-C, oder Fragmente davon, in löslicher Form zu exprimieren und auf eine Bindung der Liganden STh bzw. Uroguanylin hin zu untersuchen. Leider ist es nicht gelungen, ein der ECD von GC-C entsprechendes Konstrukt zu exprimieren das löslich, gefaltet und stabil gegenüber proteolytischem Abbau ist und mit den Liganden von GC-C interagiert. Jedoch konnten mit großem Erfolg sowohl Uroguanylin und STh als auch Mutationsvarianten dieser Peptide exprimiert werden (Weiglmeier *et al.*, 2013). Die einfache Verfügbarkeit der Liganden sowie die Möglichkeit, diese <sup>15</sup>N-markiert zu produzieren und für NMR-Titrationsexperimente einzusetzen, sollte eine große Hilfe bei der zukünftigen Suche nach

einem geeigneten, bindungsfähigen GC-C-Rezeptorfragment sein.

Außerdem zeigen die vielversprechenden Erfahrungen mit den pharmazeutischen Wirkstoffen Linaclotide und Plecanatide, die für die Behandlung von chronischer Verstopfung und obstipationsdominantem Reizdarmsyndrom entwickelt wurden, das pharmakologische Potential von Liganden der GC-C (Bryant *et al.*, 2010; Lembo *et al.*, 2011; Shailubhai *et al.*, 2013). Darüber hinaus rückt aufgrund des erst kürzlich entdeckten engen Zusammenhangs zwischen einigen Formen von kolorektalen Karzinomen und Uroguanylin-Defizienz das Konzept einer Hormon-Ersatz-Therapie mit Hilfe von Uroguanylin- und STh-Varianten in den Fokus der Darmkrebstherapie (Shailubhai *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2008). Diese Entwicklungen machen deutlich, dass einfache und skalierbare Verfahren zur Herstellung von Agonisten der GC-C von hohem medizinischem Interesse sind.

## 6 Zusammenfassung

Die Wechselwirkung der intestinalen Guanylatzyklase C (GC-C) mit den Peptidhormonen Guanylin und Uroguanylin sowie dem bakteriellen hitzestabilen Enterotoxin STh ist von entscheidender Bedeutung für die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts im Dünndarm. Guanylin, Uroguanylin und STh sind 15 bis 19 Aminosäuren lange, disulfidreiche Peptide. Ihre Bindung an die extrazelluläre Domäne (ECD) von GC-C führt zur Aktivierung von deren intrazellulärer katalytischer Guanylatzyklasedomäne und resultiert in einer durch zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) vermittelten Sekretion von Anionen ins Darmlumen. Die Rolle der STh/GC-C-Interaktion bei der durch enterotoxigene *Escherichia coli* (ETEC) induzierten akuten sekretorischen Diarrhoe und die erst kürzlich gemachte Beobachtung, dass die Aktivierung von GC-C durch ihre Liganden eine verminderte Inzidenz von kolorektalem Krebs nach sich zieht, machen GC-C zu einem vielversprechenden Ansatzpunkt innovativer Therapien. Um zum Verständnis der molekularen Grundlagen der Rezeptor/Ligand-Wechselwirkung beizutragen und als Voraussetzung für weiterführende Bindungsstudien, wurden in dieser Arbeit effiziente Protokolle zur rekombinanten Expression und Reinigung der GC-C-Liganden Uroguanylin und STh entwickelt. Außerdem wurden mutierte Varianten beider Peptide exprimiert und charakterisiert. Des Weiteren wurden mehrere rekombinante Expressionssysteme, basierend auf *Escherichia coli*, der Hefe *Pichia pastoris* und Säugerzellen, auf ihre Eignung zur Expression der extrazellulären Rezeptordomäne von GC-C oder eines geeigneten, zur Ligandenbindung befähigten Rezeptorfragments hin untersucht.

Guanylin und Uroguanylin werden *in vivo* als Prohormone exprimiert, wobei die Rolle des Propeptids darin besteht, die biologisch aktive Konformation der Hormonsequenz zu stabilisieren und die Ausbildung der nativen Disulfidverbrückung zu ermöglichen. Aus diesen Prohormonen werden die jeweiligen Hormone proteolytisch freigesetzt.

In einem ersten Schritt wurde Uroguanylin hergestellt, indem das Vorläuferprotein Prouroguanylin rekombinant exprimiert, gereinigt und tryptisch verdaut wurde. Durch NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass das aus dem Spaltansatz gereinigte Peptid die gleichen chemischen Verschiebungen aufwies wie biologisch aktives Uroguanylin. Zusammen mit dem massenspektrometrischen Nachweis der beiden im Peptid enthaltenen Disulfidbrücken diente dies als Bestätigung, dass das gereinigte Uroguanylin die korrekte Konformation annahm.

Zur rekombinanten Expression von biologisch aktivem hitzestabilem Enterotoxin STh wurde seine große strukturelle Ähnlichkeit zu Uroguanylin ausgenutzt und ein chimäres Vorläuferprotein,

bestehend aus dem N-terminalen Propeptid von Prouroguanylin und der Aminosäuresequenz von STh, entwickelt. Dieses neue Fusionsprotein wurde Prouro-STh genannt. Analog zur Situation in Prouroguanylin, in der das Propeptid die Faltung von Uroguanylin und die Ausbildung der Disulfidbrücken ermöglicht, sollte auch innerhalb des Fusionsproteins Prouro-STh die Bildung des korrekten Disulfidverbrückungsmusters unterstützt werden. Rekombinantes STh konnte in guter Ausbeute und Reinheit isoliert und anschließend strukturell charakterisiert werden (Weiglmeier *et al.*, 2013). Mit einem *in-vitro*-Aktivitätsassay wurde die biologische Aktivität von beiden rekombinanten Peptiden, Uroguanylin und STh, nachgewiesen.

Dass sich das in dieser Arbeit etablierte Expressionssystem auch zur Herstellung anderer, von Uroguanylin und STh abgeleiteter Agonisten der GC-C eignet, wurde durch die erfolgreiche Expression und Reinigung der Varianten Uroguanylin A3R D6E, STh L9Y und STh Y5R L9Y gezeigt. Das Propeptid toleriert die Punktmutationen innerhalb der Zielsequenz (Uroguanylin bzw. STh) ohne dass der Propeptid-unterstützte Faltungsmechanismus beeinträchtigt wäre.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Rezeptorfragment MiniGC-C, das mit einer Länge von 197 Aminosäuren der membrannahen Subdomäne der ECD entspricht, in *E. coli* exprimiert. MiniGC-C ist löslich und strukturiert und konnte in guter Ausbeute gereinigt werden. Jedoch wurde in NMR-Titrationsexperimenten weder eine Wechselwirkung mit Uroguanylin noch mit STh beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Ligandenbindung entgegen anderslautender Voraussagen nicht ausschließlich von der membrannahen Subdomäne vermittelt wird.

Zur Expression der gesamten extrazellulären Domäne von GC-C wurden Protokolle für *E. coli*, die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* sowie Säugerzellkultur entwickelt und evaluiert. Die beiden in *E. coli* exprimierten Konstrukte Trx-ECD-GC-C und NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C waren aufgrund von minimaler Löslichkeit einerseits und offensichtlicher Fehlfaltung und Oligomerisierung andererseits nicht geeignet, die Liganden von GC-C zu binden. Die ECD von GC-C wurde in *P. pastoris* und in Säugerzellen exprimiert, jedoch waren in beiden Fällen die Ausbeuten der Expressionen nur sehr gering. Darüber hinaus unterlagen beide Konstrukte proteolytischem Abbau und konnten nach einigen Reinigungsschritten nicht mehr detektiert werden.

Obwohl es in dieser Arbeit nicht möglich war, ein lösliches, strukturiertes und zur Ligandenbindung befähigtes Fragment von GC-C in reiner Form herzustellen, stellen die evaluierten Expressions- und Reinigungsprotokolle doch eine Grundlage für zukünftige Anstrengungen zum Erreichen dieses Ziels dar. Insbesondere ist hervorzuheben, dass mit der hier entwickelten relativ einfachen und kostengünstigen Methode zur Produktion und Isotopenmarkierung von Agonisten der GC-C, ein wichtiges Werkzeug für die NMR-spektroskopische Charakterisierung der Rezeptor/Ligand-Wechselwirkung der GC-C zur Verfügung steht. Da außerdem das pharmakologische Potential von



Uroguanylin- und STh-Varianten zunehmend in den Fokus der Forschung rückt, sind die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse ein wichtiger Beitrag zur Wirkstoffentwicklung.

## 7 Summary

The interaction of intestinal guanylyl cyclase C (GC-C) with the peptide hormones guanylin and uroguanylin and the bacterial heat-stable enterotoxin STh is of eminent importance for the maintenance of electrolyte and water homeostasis in the small intestine. Guanylin, uroguanylin and STh are peptides with a length of 15 to 19 amino acids and are rich in cystines. The binding of these peptides to the extracellular domain (ECD) of GC-C activates its intracellular guanylyl cyclase domain and triggers a cGMP-mediated secretion of anions into the intestinal lumen. GC-C is a promising target for innovative therapeutic strategies. This is illustrated by the role of the STh/GC-C interaction in acute secretory diarrheal diseases caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection as well as by the recent finding that GC-C activation by its ligands is correlated with a diminished incidence of colorectal carcinoma. In order to contribute to a better understanding of the molecular basis of this receptor/ligand interaction and to lay the foundations for further binding studies, efficient protocols for the recombinant expression and purification of the GC-C agonists uroguanylin and STh were developed in the present work. Furthermore, several recombinant expression systems, based on *Escherichia coli*, the yeast *Pichia pastoris* as well as mammalian cell lines, were explored with respect to their suitability to express the entire ECD of GC-C or a receptor fragment that is able to bind GC-C's ligands.

*In vivo*, guanylin and uroguanylin are expressed as pro-hormones. The role of the pro-peptide is to stabilize the biologically active conformation of the hormones and thereby to render possible the formation of the native disulfide linkages. The hormones are released from the respective pro-hormones by proteolytic cleavage.

As a first step, uroguanylin was produced by recombinant expression, purification and tryptic digestion of the precursor protein prouroguanylin. NMR spectroscopy could show that the purified, recombinant peptide had chemical shifts consistent with biologically active uroguanylin. The presence of uroguanylin's two disulfide bonds was confirmed by mass spectrometry. These findings showed that the purified uroguanylin adopts its native conformation.

For the recombinant expression of biologically active heat-stable enterotoxin STh its considerable structural similarity to uroguanylin was used and a chimeric precursor protein consisting of the N-terminal pro-peptide of prouroguanylin and the amino acid sequence of STh was developed. This

novel fusion protein was termed Prouro-STh. The formation of the native disulfide bond pattern of STh should be supported in the context of the fusion protein Prouro-STh in a way very similar to the situation in prouroguanylin. Using this approach, recombinant STh could be obtained in good yield and purity and was subsequently characterized (Weiglmeier *et al.*, 2013). The biological activity of both recombinant peptides, uroguanylin and STh, was confirmed by an *in vitro* activity assay.

The expression system established in the present work can be used for the production of other GC-C agonists derived from uroguanylin and STh. This has been shown by the successful expression and purification of the mutant variants uroguanylin D3R D6E, STh L9Y and STh Y5R L9Y. The pro-peptide tolerates the newly introduced point mutations in its target, i. e. the uroguanylin or STh, without any apparent impediment on pro-peptide mediated folding.

In the second part of this work the receptor fragment MiniGC-C was expressed in *E. coli*. MiniGC-C has a length of 197 amino acids and corresponds to the membrane proximal subdomain of the ECD. MiniGC-C is a folded soluble protein that can be purified at a high yield. However, NMR titration experiments were unable to confirm any interaction between MiniGC-C and uroguanylin or STh, respectively. This observation leads to the conclusion that, despite predictions to the contrary, the interaction between the ligands and the ECD is not solely mediated by the latter's membran proximal subdomain.

Several protocols for the expression of the entire ECD of GC-C in either *E. coli*, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* or mammalian cell culture were developed and evaluated. The constructs Trx-ECD-GC-C and NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C, which were used for expression in *E. coli*, were not suitable for ligand binding. While Trx-ECD-GC-C was completely insoluble the NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C fusion protein turned out to be misfolded and formed non-native oligomers. The ECD was expressed in *P. pastoris* and mammalian cell culture. However, the yield of expressed protein in both systems was low. Moreover, both constructs were quite unstable and were lost due to degradation during purification.

Although it was not possible to obtain a soluble well-folded and pure fragment of GC-C which retains the ability to bind GC-C's ligands the purification protocols evaluated in the present work offer nevertheless a basis and novel starting point for future efforts to achieve this goal. It should be highlighted that the relatively easy and inexpensive method for production and isotopic labeling of agonists of GC-C developed here is an important tool for the NMR spectroscopic characterization of receptor/ligand interactions involving GC-C. Because of the recent focus on the pharmacological potential of uroguanylin and STh variants the results presented in this work constitute an important contribution to the development of new active pharmaceutical ingredients.

## 8 Literaturverzeichnis

### 8.1 Allgemeines Literaturverzeichnis

**Albano F, Thompson MR, Orru S, Scaloni A, Musetta A, Pucci P und Guarino A** (2000) Structural and functional features of modified heat-stable toxins produced by enteropathogenic *Klebsiella* cells. *Pediatr Res* **48**: 685-690

**Albert MJ, Faruque SM, Faruque AS, Neogi PK, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Alam K und Akbar MS** (1995) Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J Clin Microbiol* **33**: 973-977

**Anderson WA, Freeman R** (1962) Influence of a Second Radiofrequency Field on High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra. *J Chem Phys* **37**: 411-415

**Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H und Russell DW** (1989) Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* **264**: 8222-8229

**Andresen V, Camilleri M, Busciglio IA, Grudell A, Burton D, McKinzie S, Foxx-Orenstein A, Kurtz CB, Sharma V, Johnston JM, Currie MG und Zinsmeister AR** (2007) Effect of 5 days linaclotide on transit and bowel function in females with constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **133**: 761-768

**Andrews EB, Eaton SC, Hollis KA, Hopkins JS, Ameen V, Hamm LR, Cook SF, Tennis P und Mangel AW** (2005) Prevalence and demographics of irritable bowel syndrome: results from a large web-based survey. *Aliment Pharmacol Ther* **22**: 935-942

**Aref NE, Saeed AM** (2012) An enhanced protocol for expression and purification of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Biochem Mol Toxicol* **26**: 168-175

**Arita M, Honda T, Miwatani T, Takeda T, Takao T und Shimonishi Y** (1991) Purification and characterization of a heat-stable enterotoxin of *Vibrio mimicus*. *FEMS Microbiol Lett* **63**: 105-110

**Bakre MM, Ghanekar Y und Visweswariah SS** (2000) Homologous desensitization of the human guanylate cyclase C receptor. Cell-specific regulation of catalytic activity. *Eur J Biochem* **267**: 179-187

**Baldi F, Bianco MA, Nardone G, Pilotto A und Zamparo E** (2009) Focus on acute diarrhoeal disease. *World J Gastroenterol* **15**: 3341-3348

**Banik ND, Ganguly U** (1989) Diacylglycerol breakdown in plasma membrane of rat intestinal epithelial cells. Effect of *E. coli* heat-stable toxin. *FEBS Lett* **250**: 201-204

**Barkhuijsen H, de Beer R, Bovee WM, Creyghton JH und van Ormondt D** (1985) Application of linear prediction and singular value decomposition (LPSVD) to determine NMR frequencies and intensities from the FID. *Magn Reson Med* **2**: 86-89

**Batisson I, der Vartanian M** (2000) Extracellular DsbA-insensitive folding of *Escherichia coli*

heat-stable enterotoxin STa *in vitro*. J Biol Chem **275**: 10582-10589

**Batissou I, Der Vartanian M, Gaillard-Martinie B und Contrepois M** (2000) Full capacity of recombinant *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin fusion proteins for extracellular secretion, antigenicity, disulfide bond formation, and activity. Infect Immun **68**: 4064-4074

**Bax A, Davis DG** (1985) MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. J Magn Reson (1969) **65**: 355-360

**Best P** (2010) Expression, Reinigung und Charakterisierung der extrazellulären Domäne der humanen Guanylatcyclase C. Bachelorarbeit, Universität Bayreuth

**Bezuidt O, Pierneef R, Mncube K, Lima-Mendez G und Reva ON** (2011) Mainstreams of horizontal gene exchange in enterobacteria: consideration of the outbreak of enterohemorrhagic *E. coli* O104:H4 in Germany in 2011. PLoS One **6**: e25702

**Bhandari R, Srinivasan N, Mahaboobi M, Ghanekar Y, Suguna K und Visweswariah SS** (2001) Functional inactivation of the human guanylyl cyclase C receptor: modeling and mutation of the protein kinase-like domain. Biochemistry **40**: 9196-9206

**Bharucha AE, Linden DR** (2010) Linaclotide - a secretagogue and antihyperalgesic agent - what next? Neurogastroenterol Motil **22**: 227-231

**Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Kock R, Fruth A, Bauwens A, Peters G und Karch H** (2011) Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. Lancet Infect Dis **11**: 671-676

**Birbe R, Palazzo JP, Walters R, Weinberg D, Schulz S und Waldman SA** (2005) Guanylyl cyclase C is a marker of intestinal metaplasia, dysplasia, and adenocarcinoma of the gastrointestinal tract. Hum Pathol **36**: 170-179

**Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH, Frederiksen CM, Laiho P, Aaltonen LA, Laurberg S, Sorensen FB, Hagemann R und ORntoft TF** (2002) Gene expression in colorectal cancer. Cancer Res **62**: 4352-4363

**Biswas KH, Shenoy AR, Dutta A und Visweswariah SS** (2009) The evolution of guanylyl cyclases as multidomain proteins: conserved features of kinase-cyclase domain fusions. J Mol Evol **68**: 587-602

**Bodenhausen G, Ruben DJ** (1980) Natural abundance nitrogen-15NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. Chem Phys Lett **69**: 185-189

**Braunschweiler L, Ernst RR** (1983) Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. J Magn Reson (1969) **53**: 521-528

**Bryant AP, Busby RW, Bartolini WP, Cordero EA, Hannig G, Kessler MM, Pierce CM, Solinga RM, Tobin JV, Mahajan-Miklos S, Cohen MB, Kurtz CB und Currie MG** (2010) Linaclotide is a potent and selective guanylate cyclase C agonist that elicits pharmacological effects locally in the gastrointestinal tract. Life Sci **86**: 760-765

**Buc E, Vartanian MD, Darcha C, Dechelotte P und Pezet D** (2005) Guanylyl cyclase C as a reliable immunohistochemical marker and its ligand *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin as a

potential protein-delivering vehicle for colorectal cancer cells. *Eur J Cancer* **41**: 1618-1627

**Buczek O, Olivera BM und Bulaj G** (2004) Propeptide does not act as an intramolecular chaperone but facilitates protein disulfide isomerase-assisted folding of a conotoxin precursor. *Biochemistry* **43**: 1093-1101

**Bullock WO, Fernandex JM und Short JM** (1987) X11-Blue: A High Efficiency Plasmid Transforming *recA Escherichia coli* Strain With Beta-Galactosidase Selection. *BioTechniques* **5**: 376-379

**Burum DR, Ernst RR** (1980) Net polarization transfer via a J-ordered state for signal enhancement of low-sensitivity nuclei. *J Magn Reson* **51**: 477-489

**Busby RW, Bryant AP, Bartolini WP, Cordero EA, Hannig G, Kessler MM, Mahajan-Miklos S, Pierce CM, Solinga RM, Sun LJ, Tobin JV, Kurtz CB und Currie MG** (2010) Linaclotide, through activation of guanylate cyclase C, acts locally in the gastrointestinal tract to elicit enhanced intestinal secretion and transit. *Eur J Pharmacol* **649**: 328-335

**Cagir B, Gelmann A, Park J, Fava T, Tankelevitch A, Bittner EW, Weaver EJ, Palazzo JP, Weinberg D, Fry RD und Waldman SA** (1999) Guanylyl cyclase C messenger RNA is a biomarker for recurrent stage II colorectal cancer. *Ann Intern Med* **131**: 805-812

**Camilleri M, Nullens S und Nelsen T** (2012) Enteroendocrine and neuronal mechanisms in pathophysiology of acute infectious diarrhea. *Dig Dis Sci* **57**: 19-27

**Carpick BW, Gariepy J** (1993) The *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is a long-lived superagonist of guanylin. *Infect Immun* **61**: 4710-4715

**Carpick BW, Gariepy J** (1991) Structural characterization of functionally important regions of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST1b. *Biochemistry* **30**: 4803-4809

**Carrithers SL** (2003) Diarrhea or colorectal cancer: can bacterial toxins serve as a treatment for colon cancer? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3018-3020

**Carrithers SL, Barber MT, Biswas S, Parkinson SJ, Park PK, Goldstein SD und Waldman SA** (1996) Guanylyl cyclase C is a selective marker for metastatic colorectal tumors in human extraintestinal tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14827-14832

**Carrithers SL, Ott CE, Hill MJ, Johnson BR, Cai W, Chang JJ, Shah RG, Sun C, Mann EA, Fonteles MC, Forte LR, Jackson BA, Giannella RA und Greenberg RN** (2004) Guanylin and uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. *Kidney Int* **65**: 40-53

**Carrithers SL, Parkinson SJ, Goldstein S, Park P, Robertson DC und Waldman SA** (1994) *Escherichia coli* heat-stable toxin receptors in human colonic tumors. *Gastroenterology* **107**: 1653-1661

**Cavanagh JR,M.** (1992) Suppression of cross-relaxation effects in TOCSY spectra via a modified DIPSI-2 mixing sequence. *J Magn Reson* **96**: 670-678

**Cavanagh J, Fairbrother WJ, III PAG, Skelton NJ** (2006) Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice. Academic Press, San Diego, CA

- Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C und Cregg JM** (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 329-332
- Cereghino JL, Cregg JM** (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 45-66
- Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV und Gardner P** (1994) Activation of intestinal CFTR Cl<sup>-</sup> channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J* **13**: 1065-1072
- Charney AN, Egnor RW, Alexander-Chacko JT, Zaharia V, Mann EA und Giannella RA** (2001) Effect of *E. coli* heat-stable enterotoxin on colonic transport in guanylyl cyclase C receptor-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**: G216-21
- Chinkers M, Singh S und Garbers DL** (1991) Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system. *J Biol Chem* **266**: 4088-4093
- Chinkers M, Wilson EM** (1992) Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant. *J Biol Chem* **267**: 18589-18597
- Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA und Hardman JG** (1975) Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J Biol Chem* **250**: 374-381
- Cohen MB, Witte DP, Hawkins JA und Currie MG** (1995) Immunohistochemical localization of guanylin in the rat small intestine and colon. *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 803-808
- Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY und Madden KR** (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol* **5**: 3376-3385
- Cregg JM, Vedvick TS und Raschke WC** (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* **11**: 905-910
- Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL und Smith CE** (1992) Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 947-951
- Dallas WS** (1990) The heat-stable toxin I gene from *Escherichia coli* 18D. *J Bacteriol* **172**: 5490-5493
- Daly R, Hearn MT** (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* **18**: 119-138
- Damon H, Dumas P und Mion F** (2004) Impact of anal incontinence and chronic constipation on quality of life. *Gastroenterol Clin Biol* **28**: 16-20
- de Jonge HR** (1975) Properties of guanylate cyclase and levels of cyclic GMP in rat small intestinal villous and crypt cells. *FEBS Lett* **55**: 143-152
- de Sauvage FJ, Camerato TR und Goeddel DV** (1991) Primary structure and functional expression of the human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J Biol Chem* **266**:

17912-17918

**de Sauvage FJ, Keshav S, Kuang WJ, Gillett N, Henzel W und Goeddel DV** (1992) Precursor structure, expression, and tissue distribution of human guanylin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9089-9093

**Derman AI, Prinz WA, Belin D und Beckwith J** (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* **262**: 1744-1747

**Dharmasathaphorn K, McRoberts JA, Mandel KG, Tisdale LD und Masui H** (1984) A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am J Physiol* **246**: G204-8

**Di Cera E, Cantwell AM** (2001) Determinants of thrombin specificity. *Ann N Y Acad Sci* **936**: 133-146

**Dreyfus LA, Harville B, Howard DE, Shaban R, Beatty DM und Morris SJ** (1993) Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3202-3206

**Duda T, Goraczniak RM und Sharma RK** (1993) Core sequence of ATP regulatory module in receptor guanylate cyclases. *FEBS Lett* **315**: 143-148

**Duda T, Sharma RK** (2008) ONE-GC membrane guanylate cyclase, a trimodal odorant signal transducer. *Biochem Biophys Res Commun* **367**: 440-445

**Duda T, Sharma RK** (2005) Two membrane juxtaposed signaling modules in ANF-RGC are interlocked. *Biochem Biophys Res Commun* **332**: 149-156

**Duda T, Yadav P, Jankowska A, Venkataraman V und Sharma RK** (2001) Three dimensional atomic model and experimental validation for the ATP-Regulated Module (ARM) of the atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase. *Mol Cell Biochem* **217**: 165-172

**Dwarakanath P, Visweswariah SS, Subrahmanyam YV, Shanthi G, Jagannatha HM und Balganesht TS** (1989) Cloning and hyperexpression of a gene encoding the heat-stable toxin of *Escherichia coli*. *Gene* **81**: 219-226

**Eutamene H, Bradesi S, Larauche M, Theodorou V, Beaufrand C, Ohning G, Fioramonti J, Cohen M, Bryant AP, Kurtz C, Currie MG, Mayer EA und Bueno L** (2010) Guanylate cyclase C-mediated antinociceptive effects of linacotide in rodent models of visceral pain. *Neurogastroenterol Motil* **22**: 312-e84

**Evans DG, Evans DJ,Jr und Pierce NF** (1973) Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **7**: 873-880

**Fairlie WD, Zhang HP, Wu WM, Pankhurst SL, Bauskin AR, Russell PK, Brown PK und Breit SN** (2001) The propeptide of the transforming growth factor-beta superfamily member, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), is a multifunctional domain that can facilitate protein folding and secretion. *J Biol Chem* **276**: 16911-16918

**Fan X, Hamra FK, London RM, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Smith CE, Currie MG und Forte LR** (1997) Structure and activity of uroguanylin and guanylin from the intestine and urine of rats. *Am J Physiol* **273**: E957-64

- Fischer M** (2010) Reinigung der extrazellulären Domäne der Guanylatcyclase C und Interaktionsstudien mit ihren Liganden. Masterarbeit, Universität Bayreuth
- Fleckenstein JM, Hardwidge PR, Munson GP, Rasko DA, Sommerfelt H und Steinsland H** (2010) Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect* **12**: 89-98
- Fleischer J, Mamasuew K und Breer H** (2009) Expression of cGMP signaling elements in the Grueneberg ganglion. *Histochem Cell Biol* **131**: 75-88
- Fonteles MC, Carrithers SL, Monteiro HS, Carvalho AF, Coelho GR, Greenberg RN und Forte LR** (2001) Renal effects of serine-7 analog of lymphoguanylin in ex vivo rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**: F207-13
- Fonteles MC, do Nascimento NR** (2011) Guanylin peptide family: history, interactions with ANP, and new pharmacological perspectives. *Can J Physiol Pharmacol* **89**: 575-585
- Forte LR, Eber SL, Fan X, London RM, Wang Y, Rowland LM, Chin DT, Freeman RH und Krause WJ** (1999) Lymphoguanylin: cloning and characterization of a unique member of the guanylin peptide family. *Endocrinology* **140**: 1800-1806
- Friedrich A** (2011) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4: are we prepared now? *Euro Surveill* **16**: 19938
- Friedrich MS** (1995) A Model-free Algorithm for the Removal of Baseline Artifacts. *J Biomol NMR* **5**: 147-153
- Fulle HJ, Vassar R, Foster DC, Yang RB, Axel R und Garbers DL** (1995) A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3571-3575
- Gali H, Sieckman GL, Hoffman TJ, Owen NK, Mazuru DG, Forte LR und Volkert WA** (2002) Chemical synthesis of *Escherichia coli* ST(h) analogues by regioselective disulfide bond formation: biological evaluation of an (111)In-DOTA-Phe(19)-ST(h) analogue for specific targeting of human colon cancers. *Bioconj Chem* **13**: 224-231
- Garcia KC, de Sauvage FJ, Struble M, Henzel W, Reilly D und Goeddel DV** (1993) Processing and characterization of human proguanylin expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 22397-22401
- Gariepy J, Judd AK und Schoolnik GK** (1987) Importance of disulfide bridges in the structure and activity of *Escherichia coli* enterotoxin ST1b. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8907-8911
- Gariepy J, Lane A, Frayman F, Wilbur D, Robien W, Schoolnik GK und Jardetzky O** (1986) Structure of the toxic domain of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST I. *Biochemistry* **25**: 7854-7866
- Ghanekar Y, Chandrashaker A, Tatu U und Visweswariah SS** (2004) Glycosylation of the receptor guanylate cyclase C: role in ligand binding and catalytic activity. *Biochem J* **379**: 653-663
- Ghanekar Y, Chandrashaker A und Visweswariah SS** (2003) Cellular refractoriness to the heat-stable enterotoxin peptide is associated with alterations in levels of the differentially glycosylated



forms of guanylyl cyclase C. Eur J Biochem **270**: 3848-3857

**Giannella RA** (1976) Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. Infect Immun **14**: 95-99

**Giblin MF, Gali H, Sieckman GL, Owen NK, Hoffman TJ, Volkert WA und Forte LR** (2006a) *In vitro* and *in vivo* evaluation of <sup>111</sup>In-labeled *E. coli* heat-stable enterotoxin analogs for specific targeting of human breast cancers. Breast Cancer Res Treat **98**: 7-15

**Giblin MF, Sieckman GL, Shelton TD, Hoffman TJ, Forte LR und Volkert WA** (2006b) *In vitro* and *in vivo* evaluation of <sup>177</sup>Lu- and <sup>90</sup>Y-labeled *E. coli* heat-stable enterotoxin for specific targeting of uroguanylin receptors on human colon cancers. Nucl Med Biol **33**: 481-488

**Giblin MF, Sieckman GL, Watkinson LD, Daibes-Figueroa S, Hoffman TJ, Forte LR und Volkert WA** (2006c) Selective targeting of *E. coli* heat-stable enterotoxin analogs to human colon cancer cells. Anticancer Res **26**: 3243-3251

**Gluzman Y** (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell **23**: 175-182

**Golin-Bisello F, Bradbury N und Ameen N** (2005) STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. Am J Physiol Cell Physiol **289**: C708-16

**Goyal J, Ganguly NK, Mahajan RC, Garg UC und Walia BN** (1987) Studies on the mechanism of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-induced diarrhoea in mice. Biochim Biophys Acta **925**: 341-346

**Graham FL, Smiley J, Russell WC und Nairn R** (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol **36**: 59-74

**Grant SG, Jessee J, Bloom FR und Hanahan D** (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 4645-4649

**Greenberg RN, Guerrant RL** (1981) *E. coli* heat-stable enterotoxin. Pharmacol Ther **13**: 507-531

**Greenberg RN, Ping Z, Biek DP und Mann DM** (1991) High-level expression and secretion of a lysine-containing analog of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Protein Expr Purif **2**: 394-401

**Gronenborn AM, Bax A, Wingfield PT und Clore M** (1989) A powerful method of sequential proton resonance assignment in proteins using relayed <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H multiple quantum coherence spectroscopy. FEBS Lett **243**: 93-98

**Guarino A, Capano G, Malamisura B, Alessio M, Guandalini S und Rubino A** (1987) Production of *Escherichia coli* STa-like heat-stable enterotoxin by *Citrobacter freundii* isolated from humans. J Clin Microbiol **25**: 110-114

**Hamra FK, Eber SL, Chin DT, Currie MG und Forte LR** (1997) Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 2705-2710

- Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyj NV, Krause WJ, Freeman RH, Chin DT, Tompkins JA, Fok KF und Smith CE** (1993) Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10464-10468
- HanksSK, Hunter T** (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* **9**: 576-596
- Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G und Bohme E** (1990) Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* **272**: 221-223
- Hasegawa M, Hidaka Y, Matsumoto Y, Sanni T und Shimonishi Y** (1999a) Determination of the binding site on the extracellular domain of guanylyl cyclase C to heat-stable enterotoxin. *J Biol Chem* **274**: 31713-31718
- Hasegawa M, Hidaka Y, Wada A, Hirayama T und Shimonishi Y** (1999b) The relevance of N-linked glycosylation to the binding of a ligand to guanylate cyclase C. *Eur J Biochem* **263**: 338-346
- Hasegawa M, Kawano Y, Matsumoto Y, Hidaka Y, Fujii J, Taniguchi N, Wada A, Hirayama T und Shimonishi Y** (1999c) Expression and characterization of the extracellular domain of guanylyl cyclase C from a baculovirus and Sf21 insect cells. *Protein Expr Purif* **15**: 271-281
- Hasegawa M, Matsumoto-Ishikawa Y, Hijikata A, Hidaka Y, Go M und Shimonishi Y** (2005) Disulfide linkages and a three-dimensional structure model of the extracellular ligand-binding domain of guanylyl cyclase C. *Protein J* **24**: 315-325
- He P, Yun CC** (2010) Mechanisms of the regulation of the intestinal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 238080
- Hess R, Kuhn M, Schulz-Knappe P, Raida M, Fuchs M, Klodt J, Adermann K, Kaever V, Cetin Y und Forssmann WG** (1995) GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett* **374**: 34-38
- Hidaka Y, Ohno M, Hemmasi B, Hill O, Forssmann WG und Shimonishi Y** (1998) *In vitro* disulfide-coupled folding of guanylyl cyclase-activating peptide and its precursor protein. *Biochemistry* **37**: 8498-8507
- Hidaka Y, Shimono C, Ohno M, Okumura N, Adermann K, Forssmann WG und Shimonishi Y** (2000) Dual function of the propeptide of prouroguanylin in the folding of the mature peptide: disulfide-coupled folding and dimerization. *J Biol Chem* **275**: 25155-25162
- Higgins PD, Johanson JF** (2004) Epidemiology of constipation in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* **99**: 750-759
- Hill O, Cetin Y, Cieslak A, Magert HJ und Forssmann WG** (1995) A new human guanylate cyclase-activating peptide (GCAP-II, uroguanylin): precursor cDNA and colonic expression. *Biochim Biophys Acta* **1253**: 146-149
- Hirayama T, Wada A, Hidaka Y, Fujisawa J, Takeda Y und Shimonishi Y** (1993) Expression of a truncated guanylate cyclase (GC-C), a receptor for heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*, and its dimer formation in COS-7 cells. *Microb Pathog* **15**: 283-291

- Hirayama T, Wada A, Iwata N, Takasaki S, Shimonishi Y und Takeda Y** (1992) Glycoprotein receptors for a heat-stable enterotoxin (STh) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **60**: 4213-4220
- Hodson CA, Ambrogi IG, Scott RO, Mohler PJ und Milgram SL** (2006) Polarized apical sorting of guanylyl cyclase C is specified by a cytosolic signal. *Traffic* **7**: 456-464
- Holmes WJ, Darby RA, Wilks MD, Smith R und Bill RM** (2009) Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. *Microb Cell Fact* **8**: 35
- Hugues M, Crane MR, Thomas BR, Robertson D, Gazzano H, O'Hanley P und Waldman SA** (1992) Affinity purification of functional receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin from rat intestine. *Biochemistry* **31**: 12-16
- Hwang TL, Shaka AJ** (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave forms and pulsed gradients. *J Magn Res* **112A**: 275-279
- Ikemura H, Yoshimura S, Aimoto S, Shimonishi Y, Hara S, Takeda T, Takeda Y und Miwatani T** (1984) Synthesis of a Heat-stable Enterotoxin (ST<sub>h</sub>) Produced by a Human Strain SK-1 of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Bull Chem Soc Jpn* **57**: 2543-2549
- Invitrogen, Carlsbad, CA, USA** (2009)  
Multi-Copy *Pichia* Expression Kit. Manual, No 25-0170
- Invitrogen, Carlsbad, CA, USA** (2002) *Pichia* Fermentation Process Guidelines. Manual
- Jeener J, Meier BH, Bachmann P und Ernst RR** (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J Chem Phys* **71**: 4546-4553
- Johnson BA, Blevins RA** (1994) NMRview: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J Biomol NMR* **4**: 603-614
- Johnson WC** (1999) Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* **35**: 307-312
- Kamenetsky M, Middelhaufe S, Bank EM, Levin LR, Buck J und Steegborn C** (2006) Molecular Details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol* **362**: 623-639
- Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno T, Chang BY, Waldman SA und Murad F** (1986) Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem* **261**: 7236-7241
- Kay L, Keifer EP und Saarinen T** (1992) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J Am Chem Soc* **114**: 10663-10665
- Khare S, Wilson D, Wali RK, Tien XY, Bissonnette M, Niedziela SM, Bolt MJ, Sitrin MD und Brasitus TA** (1994) Guanylin activates rat colonic particulate guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 1432-1437
- Kita T, Smith CE, Fok KF, Duffin KL, Moore WM, Karabatsos PJ, Kachur JF, Hamra FK,**

- Pidhorodeckyj NV und Forte LR** (1994) Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am J Physiol* **266**: F342-8
- Klipstein FA, Engert RF und Houghten RA** (1983) Immunological properties of purified *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* **42**: 838-841
- Klodt J, Kuhn M, Marx UC, Martin S, Rosch P, Forssmann WG und Adermann K** (1997) Synthesis, biological activity and isomerism of guanylate cyclase C-activating peptides guanylin and uroguanylin. *J Pept Res* **50**: 222-230
- Knake C, Burmann BM, Schweimer K, Matecko I und Rosch P** (2009) The membrane proximal extracellular domain of human hGC-B folds independently. *J Biomol Struct Dyn* **26**: 465-472
- Koller KJ, de Sauvage FJ, Lowe DG und Goeddel DV** (1992) Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol Cell Biol* **12**: 2581-2590
- Krause G, Bayerl A, Heim JM, Singh S und Gerzer R** (1994a) Distribution of membrane bound guanylyl cyclases in human intestine. *Gut* **35**: 1250-1257
- Krause WJ, Cullingford GL, Freeman RH, Eber SL, Richardson KC, Fok KF, Currie MG und Forte LR** (1994b) Distribution of heat-stable enterotoxin/guanylin receptors in the intestinal tract of man and other mammals. *J Anat* **184** ( Pt 2): 407-417
- Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR und Gilman AG** (1989) Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* **244**: 1558-1564
- Kuno T, Andresen JW, Kamisaki Y, Waldman SA, Chang LY, Saheki S, Leitman DC, Nakane M und Murad F** (1986) Co-purification of an atrial natriuretic factor receptor and particulate guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* **261**: 5817-5823
- Kurosaki T, Hikida M** (2009) Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol Rev* **228**: 132-148
- Kuwae S, Ohyama M, Ohya T, Ohi H und Kobayashi K** (2005) Production of recombinant human antithrombin by *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* **99**: 264-271
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lauber T** (2003) Strukturbestimmung des humanen Guanylin-Prohormons zur Analyse der Rolle einer Hormon-Prosequenz und Design eines löslichen Fragments der extrazellulären Domäne der Guanylatzyklase-C. Doktorarbeit, Universität Bayreuth.
- Lauber T, Neudecker P, Rösch P und Marx UC** (2003) Solution structure of human proguanylin: the role of a hormone prosequence. *J Biol Chem* **278**: 24118-24124
- Lauber T, Tidten N, Matecko I, Zeeb M, Rösch P und Marx UC** (2009) Design and characterization of a soluble fragment of the extracellular ligand-binding domain of the peptide hormone receptor guanylyl cyclase-C. *Protein Eng Des Sel* **22**: 1-7

- Lembo AJ, Kurtz CB, Macdougall JE, Lavins BJ, Currie MG, Fitch DA, Jeglinski BI und Johnston JM** (2010) Efficacy of linaclotide for patients with chronic constipation. *Gastroenterology* **138**: 886-95.e1
- Lembo AJ, Schneier HA, Shiff SJ, Kurtz CB, MacDougall JE, Jia XD, Shao JZ, Lavins BJ, Currie MG, Fitch DA, Jeglinski BI, Eng P, Fox SM und Johnston JM** (2011) Two randomized trials of linaclotide for chronic constipation. *N Engl J Med* **365**: 527-536
- Leo B** (2009) Die extrazelluläre Domäne des humanen Photorezeptors retGC1 und das humane Peptidhormon Uroguanylin. Diplomarbeit, Universität Bayreuth
- Leong SA, Barghout V, Birnbaum HG, Thibeault CE, Ben-Hamadi R, Frech F und Ofman JJ** (2003) The economic consequences of irritable bowel syndrome: a US employer perspective. *Arch Intern Med* **163**: 929-935
- Levine MM, Caplan ES, Waterman D, Cash RA, Hornick RB und Snyder MJ** (1977) Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* **17**: 78-82
- Levine MM, Ferreccio C, Prado V, Cayazzo M, Abrego P, Martinez J, Maggi L, Baldini MM, Martin W und Maneval D** (1993) Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am J Epidemiol* **138**: 849-869
- Levine MM, Rennels MB, Cisneros L, Hughes TP, Nalin DR und Young CR** (1980) Lack of person-to-person transmission of enterotoxigenic *Escherichia coli* despite close contact. *Am J Epidemiol* **111**: 347-355
- Li P, Lin JE, Snook AE, Gibbons AV, Zuzga DS, Schulz S, Pitari GM und Waldman SA** (2008) Colorectal cancer is a paracrine deficiency syndrome amenable to oral hormone replacement therapy. *Clin Transl Sci* **1**: 163-167
- Li P, Schulz S, Bombonati A, Palazzo JP, Hyslop TM, Xu Y, Baran AA, Siracusa LD, Pitari GM und Waldman SA** (2007) Guanylyl cyclase C suppresses intestinal tumorigenesis by restricting proliferation and maintaining genomic integrity. *Gastroenterology* **133**: 599-607
- Li Z, Taylor-Blake B, Light AR und Goy MF** (1995) Guanylin, an endogenous ligand for C-type guanylate cyclase, is produced by goblet cells in the rat intestine. *Gastroenterology* **109**: 1863-1875
- Lin JE, Li P, Snook AE, Schulz S, Dasgupta A, Hyslop TM, Gibbons AV, Marszlowicz G, Pitari GM und Waldman SA** (2010a) The hormone receptor GUCY2C suppresses intestinal tumor formation by inhibiting AKT signaling. *Gastroenterology* **138**: 241-254
- Lin JE, Valentino M, Marszlowicz G, Magee MS, Li P, Snook AE, Stoecker BA, Chang C und Waldman SA** (2010b) Bacterial heat-stable enterotoxins: translation of pathogenic peptides into novel targeted diagnostics and therapeutics. *Toxins (Basel)* **2**: 2028-2054
- Liu D, Overbey D, Watkinson LD, Daibes-Figueroa S, Hoffman TJ, Forte LR, Volkert WA und Giblin MF** (2009) *In vivo* imaging of human colorectal cancer using radiolabeled analogs of the uroguanylin peptide hormone. *Anticancer Res* **29**: 3777-3783
- Liu M, Mao X, Ye C, Huang H, Nicholson JK und Lindon JC** (1998) Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J Magn Reson* **132**: 125-129

- Longstreth GF, Wilson A, Knight K, Wong J, Chiou CF, Barghout V, Frech F und Ofman JJ** (2003) Irritable bowel syndrome, health care use, and costs: a U.S. managed care perspective. *Am J Gastroenterol* **98**: 600-607
- Lopez AD, Begg S, Bos E** (2006) Demographic and Epidemiological Characteristics of Major Regions, 1990-2001. **In:** Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL (eds), *Global Burden of Disease and Risk Factors*. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank Group, Washington (DC), USA, S. 17-44
- Lortie LA, Dubreuil JD und Harel J** (1991) Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**: 656-659
- Lowe DG** (1992) Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase is self-associated prior to hormone binding. *Biochemistry* **31**: 10421-10425
- Lowe DG, Dizhoor AM, Liu K, Gu Q, Spencer M, Laura R, Lu L und Hurley JB** (1995) Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5535-5539
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP und Waldman SA** (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* **52**: 375-414
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B und Harvey LM** (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**: 249-270
- Mann EA, Jump ML, Wu J, Yee E und Giannella RA** (1997) Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 463-466
- Marion D, Ikura M, Tschudin R und Bax A** (1989) Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J Magn Reson* **85**: 393-399
- Martin S, Adermann K, Forssmann WG und Kuhn M** (1999) Regulated, side-directed secretion of proguanylin from isolated rat colonic mucosa. *Endocrinology* **140**: 5022-5029
- Marx UC, Klodt J, Meyer M, Gerlach H, Rosch P, Forssmann WG und Adermann K** (1998) One peptide, two topologies: structure and interconversion dynamics of human uroguanylin isomers. *J Pept Res* **52**: 229-240
- Masuda T, Ueno Y und Kitabatake N** (2005) High yield secretion of the sweet-tasting protein lysozyme from the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **39**: 35-42
- Matecko I, Burmann BM, Schweimer K, Kalbacher H, Einsiedel J, Gmeiner P und Rösch P** (2008) Structural Characterization of the *E. coli* Heat Stable Enterotoxin STh. *Open Spectrosc J* **2**: 34-39
- Matthews JB, Awtrey CS, Thompson R, Hung T, Tally KJ und Madara JL** (1993) Na(+)-K(+)-2Cl<sup>-</sup> cotransport and Cl<sup>-</sup> secretion evoked by heat-stable enterotoxin is microfilament dependent in T84 cells. *Am J Physiol* **265**: G370-8

- Menard LP, Dubreuil JD** (2002) Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* **28**: 43-60
- Menard LP, Lussier JG, Lepine F, Paiva de Sousa C und Dubreuil JD** (2004) Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1. *Protein Expr Purif* **33**: 223-231
- Mendez Arancibia E, Pitart C, Ruiz J, Marco F, Gascon J und Vila J** (2009) Evolution of antimicrobial resistance in enteroaggregative *Escherichia coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli* causing traveller's diarrhoea. *J Antimicrob Chemother* **64**: 343-347
- Meyer MR, Angele A, Kremmer E, Kaupp UB und Muller F** (2000) A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10595-10600
- Misono KS, Sivasubramanian N, Berkner K und Zhang X** (1999) Expression and purification of the extracellular ligand-binding domain of the atrial natriuretic peptide (ANP) receptor: monovalent binding with ANP induces 2:2 complexes. *Biochemistry* **38**: 516-523
- Morgan WD, Birdsall B, Frenkiel TA, Gradwell MG, Burghaus PA, Syed SE, Uthaipibull C, Holder AA und Feeney J** (1999) Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *J Mol Biol* **289**: 113-122
- Morgan WD, Kragt A und Feeney J** (2000) Expression of deuterium-isotope-labelled protein in the yeast *Pichia pastoris* for NMR studies. *J Biomol NMR* **17**: 337-347
- Mori S, Abeygunawardana C, Johnson MO und van Zijl PC** (1995) Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation. *J Magn Reson B* **108**: 94-8
- Morris GA, Freeman R** (1979) Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *J Am Chem Soc* **101**: 760-762
- Moseley SL, Samadpour-Motalebi M und Falkow S** (1983) Plasmid association and nucleotide sequence relationships of two genes encoding heat-stable enterotoxin production in *Escherichia coli* H-10407. *J Bacteriol* **156**: 441-443
- Moss NG, Fellner RC, Qian X, Yu SJ, Li Z, Nakazato M und Goy MF** (2008) Uroguanylin, an intestinal natriuretic peptide, is delivered to the kidney as an unprocessed propeptide. *Endocrinology* **149**: 4486-4498
- Mueller L** (1979) Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence. *J Am Chem Soc* **101**: 4481-4484
- Nair GB, Takeda Y** (1998) The heat-stable enterotoxins. *Microb Pathog* **24**: 123-131
- Nakauchi M, Suzuki N** (2005) Enterotoxin/guanylin receptor type guanylyl cyclases in non-mammalian vertebrates. *Zoolog Sci* **22**: 501-509
- Nakazato M, Yamaguchi H, Date Y, Miyazato M, Kangawa K, Goy MF, Chino N und Matsukura S** (1998) Tissue distribution, cellular source, and structural analysis of rat immunoreactive uroguanylin. *Endocrinology* **139**: 5247-5254

- Nandi A, Mathew R und Visweswariah SS** (1996) Expression of the extracellular domain of the human heat-stable enterotoxin receptor in *Escherichia coli* and generation of neutralizing antibodies. *Protein Expr Purif* **8**: 151-159
- Nataro JP, Kaper JB** (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201
- Navaneethan U, Giannella RA** (2008) Mechanisms of infectious diarrhea. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **5**: 637-647
- Niyogi SK** (2005) Shigellosis. *J Microbiol* **43**: 133-143
- Northey G, Evans MR, Sarvotham TS, Thomas DR und Howard TJ** (2007) Sentinel surveillance for travellers' diarrhoea in primary care. *BMC Infect Dis* **7**: 126
- Nzegwu HC, Levin RJ** (1996) Luminal capsaicin inhibits fluid secretion induced by enterotoxin *E. coli* STa, but not by carbachol, *in vivo* in rat small and large intestine. *Exp Physiol* **81**: 313-315
- Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM und Misono KS** (2004) Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *J Biol Chem* **279**: 28625-28631
- Ogawa H, Zhang X, Qiu Y, Ogata CM und Misono KS** (2003) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the atrial natriuretic peptide (ANP) receptor extracellular domain complex with ANP: use of ammonium sulfate as the cryosalt. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 1831-1833
- O'Grady SM, Jiang X, Maniak PJ, Birmachu W, Scribner LR, Bulbulian B und Gullikson GW** (2002) Cyclic AMP-dependent Cl secretion is regulated by multiple phosphodiesterase subtypes in human colonic epithelial cells. *J Membr Biol* **185**: 137-144
- Okamoto K, Takahara M** (1990) Synthesis of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STp as a pre-pro form and role of the pro sequence in secretion. *J Bacteriol* **172**: 5260-5265
- Okeke IN** (2009) Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. *J Infect Dev Ctries* **3**: 817-842
- Ostedgaard LS, Baldursson O und Welsh MJ** (2001) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by its R domain. *J Biol Chem* **276**: 7689-7692
- Outchkourov NS, Stiekema WJ und Jongsma MA** (2002) Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **24**: 18-24
- Ozaki H, Sato T, Kubota H, Hata Y, Katsube Y und Shimonishi Y** (1991) Molecular structure of the toxin domain of heat-stable enterotoxin produced by a pathogenic strain of *Escherichia coli*. A putative binding site for a binding protein on rat intestinal epithelial cell membranes. *J Biol Chem* **266**: 5934-5941
- Pai CH, Mors V** (1978) Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **19**: 908-911
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS und Glass RI** (2006) Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* **12**: 304-306



- Park J, Schulz S und Waldman SA** (2000) Intestine-specific activity of the human guanylyl cyclase C promoter is regulated by Cdx2. *Gastroenterology* **119**: 89-96
- Paul AK, Marala RB, Jaiswal RK und Sharma RK** (1987) Coexistence of guanylate cyclase and atrial natriuretic factor receptor in a 180-kD protein. *Science* **235**: 1224-1226
- Perkins A, Goy MF und Li Z** (1997) Uroguanylin is expressed by enterochromaffin cells in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **113**: 1007-1014
- Picciotto MR, Cohn JA, Bertuzzi G, Greengard P und Nairn AC** (1992) Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **267**: 12742-12752
- Pitari GM, Di Guglielmo MD, Park J, Schulz S und Waldman SA** (2001) Guanylyl cyclase C agonists regulate progression through the cell cycle of human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7846-7851
- Pitari GM, Lin JE, Shah FJ, Lubbe WJ, Zuzga DS, Li P, Schulz S und Waldman SA** (2008) Enterotoxin preconditioning restores calcium-sensing receptor-mediated cytostasis in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **29**: 1601-1607
- Pitari GM, Zingman LV, Hodgson DM, Alekseev AE, Kazerounian S, Bienengraeber M, Hajnoczky G, Terzic A und Waldman SA** (2003) Bacterial enterotoxins are associated with resistance to colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2695-2699
- Potter LR, Hunter T** (1998) Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol Cell Biol* **18**: 2164-2172
- Price-Carter M, Gray WR und Goldenberg DP** (1996a) Folding of omega-conotoxins. 1. Efficient disulfide-coupled folding of mature sequences *in vitro*. *Biochemistry* **35**: 15537-15546
- Price-Carter M, Gray WR und Goldenberg DP** (1996b) Folding of omega-conotoxins. 2. Influence of precursor sequences and protein disulfide isomerase. *Biochemistry* **35**: 15547-15557
- Prinz WA, Aslund F, Holmgren A und Beckwith J** (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* **272**: 15661-15667
- Pugsley AP** (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 50-108
- Qadri F, Saha A, Ahmed T, Al Tarique A, Begum YA und Svennerholm AM** (2007) Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. *Infect Immun* **75**: 3961-3968
- Rajalingam D, Kathir KM, Ananthamurthy K, Adams PD und Kumar TK** (2008) A method for the prevention of thrombin-induced degradation of recombinant proteins. *Anal Biochem* **375**: 361-363
- Ramamurthy T** (2008) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): the bug in our backyard. *Indian J Med Res* **128**: 233-236
- Rao MR, Abu-Elyazeed R, Savarino SJ, Naficy AB, Wierzbza TF, Abdel-Messih I, Shaheen H,**

- French RW, Jr, Svennerholm AM und Clemens JD** (2003) High disease burden of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* among rural Egyptian infants and young children. *J Clin Microbiol* **41**: 4862-4864
- Rao SP, Sellers Z, Crombie DL, Hogan DL, Mann EA, Childs D, Keely S, Sheil-Puopolo M, Giannella RA, Barrett KE, Isenberg JI und Pratha VS** (2004) A role for guanylate cyclase C in acid-stimulated duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**: G95-G101
- Rasheed JK, Guzman-Verduzco LM und Kupersztoch YM** (1990) Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: evidence of extracellular processing. *Mol Microbiol* **4**: 265-273
- Rattenholl A, Ruoppolo M, Flagiello A, Monti M, Vinci F, Marino G, Lilie H, Schwarz E und Rudolph R** (2001) Pro-sequence assisted folding and disulfide bond formation of human nerve growth factor. *J Mol Biol* **305**: 523-533
- Reissner C, Klose M, Fairless R und Missler M** (2008) Mutational analysis of the neurexin/neuroligin complex reveals essential and regulatory components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15124-15129
- Richardson JS** (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv Protein Chem* **34**: 167-339
- Rodas C, Mamani R, Blanco J, Blanco JE, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjöling A und Iniguez V** (2011) Enterotoxins, colonization factors, serotypes and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from hospitalized children with diarrhea in Bolivia. *Braz J Infect Dis* **15**: 132-137
- Rodriguez E, Krishna NR** (2001) An economical method for (15)N/(13)C isotopic labeling of proteins expressed in *Pichia pastoris*. *J Biochem* **130**: 19-22
- Rosales-Mendoza S, Alpuche-Solis AG, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Martinez-Gonzalez L, Herrera-Diaz A und Korban SS** (2009) Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *Plant J* **57**: 45-54
- Rösch P, Weiglmeier P und Berkner H.** Method for producing multiple recombinant disulfide bridged peptides. **Schutzrecht EP2548882 A1** (23.01.2013), ALNuMed UG (haftungsbeschränkt), Pr.: DE20111008075 07.01.2011
- Rudner XL, Mandal KK, de Sauvage FJ, Kindman LA und Almenoff JS** (1995) Regulation of cell signaling by the cytoplasmic domains of the heat-stable enterotoxin receptor: identification of autoinhibitory and activating motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5169-5173
- Ryder RW, Sack DA, Kapikian AZ, McLaughlin JC, Chakraborty J, Mizanur Rahman AS, Merson MH und Wells JG** (1976) Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Reovirus-like agent in rural Bangladesh. *Lancet* **1**: 659-663
- Sack RB** (2011) The discovery of cholera - like enterotoxins produced by *Escherichia coli* causing secretory diarrhoea in humans. *Indian J Med Res* **133**: 171-180

- Sack RB** (1975) Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Annu Rev Microbiol **29**: 333-353
- Saha S, Gupta DD und Chakrabarti MK** (2005) Involvement of phospholipase C in *Yersinia enterocolitica* heat stable enterotoxin (Y-STa) mediated rise in intracellular calcium level in rat intestinal epithelial cells. Toxicon **45**: 361-367
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA und Arnheim N** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science **230**: 1350-1354
- Saito YA, Schoenfeld P und Locke GR,3rd** (2002) The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systematic review. Am J Gastroenterol **97**: 1910-1915
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sanchez J, Solorzano RM und Holmgren J** (1993) Extracellular secretion of STa heat-stable enterotoxin by *Escherichia coli* after fusion to a heterologous leader peptide. FEBS Lett **330**: 265-269
- Sato T, Ozaki H, Hata Y, Kitagawa Y, Katsube Y und Shimonishi Y** (1994) Structural characteristics for biological activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*: X-ray crystallography of weakly toxic and nontoxic analogs. Biochemistry **33**: 8641-8650
- Sato T, Shimonishi Y** (2004) Structural features of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin that activates membrane-associated guanylyl cyclase. J Pept Res **63**: 200-206
- Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S und Guerry P** (1993a) Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 3093-3097
- Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S und Guerry P** (1993b) Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 3093-3097
- Schenk J, Balazs K, Jungo C, Urfer J, Wegmann C, Zocchi A, Marison IW und von Stockar U** (2008) Influence of specific growth rate on specific productivity and glycosylation of a recombinant avidin produced by a *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> strain. Biotechnol Bioeng **99**: 368-377
- Schleucher J, Schwendinger M, Sattler M, Schmidt P, Schedletzky O, Glaser SJ, Sorensen OW und Griesinger C** (1994) A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. J Biomol NMR **4**: 301-306
- Schmid FX** (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: Creighton TE (ed), Protein structure. A practical approach. IRL Press, Oxford, Großbritannien, S. 251-285
- Schulz A, Escher S, Marx UC, Meyer M, Rosch P, Forssmann WG und Adermann K** (1998) Carboxy-terminal extension stabilizes the topological stereoisomers of guanylin. J Pept Res **52**: 518-525

- Schulz A, Marx UC, Hidaka Y, Shimonishi Y, Rosch P, Forssmann WG und Adermann K** (1999) Role of the prosequence of guanylin. *Protein Sci* **8**: 1850-1859
- Schulz A, Marx UC, Tidten N, Lauber T, Hidaka Y und Adermann K** (2005) Side chain contributions to the interconversion of the topological isomers of guanylin-like peptides. *J Pept Sci* **11**: 319-330
- Schulz S, Green CK, Yuen PS und Garbers DL** (1990) Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* **63**: 941-948
- Schulz S, Hyslop T, Haaf J, Bonaccorso C, Nielsen K, Witek ME, Birbe R, Palazzo J, Weinberg D und Waldman SA** (2006) A validated quantitative assay to detect occult micrometastases by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of guanylyl cyclase C in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 4545-4552
- Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H und Garbers DL** (1989) The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* **58**: 1155-1162
- Schulz S, Wedel BJ, Matthews A und Garbers DL** (1998) The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor. *J Biol Chem* **273**: 1032-1037
- Schuster D** (2004) Expression, Reinigung und biophysikalische Charakterisierung des Prohormons von Uroguanylin. Diplomarbeit, Universität Bayreuth
- Schweimer K, Marg BL, Oesterhelt D, Rosch P und Sticht H** (2000) Sequence-specific <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignments and secondary structure of [2Fe-2S] ferredoxin from *Halobacterium salinarum*. *J Biomol NMR* **16**: 347-348
- Scott RO, Thelin WR und Milgram SL** (2002) A novel PDZ protein regulates the activity of guanylyl cyclase C, the heat-stable enterotoxin receptor. *J Biol Chem* **277**: 22934-22941
- Sears CL, Kaper JB** (1996) Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* **60**: 167-215
- Sellers ZM, Childs D, Chow JY, Smith AJ, Hogan DL, Isenberg JI, Dong H, Barrett KE und Pratha VS** (2005) Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* stimulates a non-CFTR-mediated duodenal bicarbonate secretory pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**: G654-63
- Sellers ZM, Mann E, Smith A, Ko KH, Giannella R, Cohen MB, Barrett KE und Dong H** (2008) Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) can stimulate duodenal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion via a novel GC-C- and CFTR-independent pathway. *FASEB J* **22**: 1306-1316
- Shailubhai K, Comiskey S, Foss JA, Feng R, Barrow L, Comer GM und Jacob GS** (2013) Plecanatide, an Oral Guanylate Cyclase C Agonist Acting Locally in the Gastrointestinal Tract, Is Safe and Well-Tolerated in Single Doses. *Dig Dis Sci*, doi: 10.1007/s10620-013-2684-z
- Shailubhai K, Yu HH, Karunanandaa K, Wang JY, Eber SL, Wang Y, Joo NS, Kim HD, Miedema BW, Abbas SZ, Boddupalli SS, Currie MG und Forte LR** (2000) Uroguanylin treatment suppresses polyp formation in the Apc(Min/+) mouse and induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via cyclic GMP. *Cancer Res* **60**: 5151-5157

- Shaka AJ, Barker PB und Freeman R** (1985) Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J Magn Reson* **64**: 547-552
- Shaka AJ, Keeler J und Freeman R** (1983) Evaluation of a new broadband decoupling sequence: WALTZ-16. *J Magn Reson* **53**: 313-340
- Shimonishi Y, Hidaka Y, Koizumi M, Hane M, Aimoto S, Takeda T, Miwatani T und Takeda Y** (1987) Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **215**: 165-170
- Shyjan AW, de Sauvage FJ, Gillett NA, Goeddel DV und Lowe DG** (1992) Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase. *Neuron* **9**: 727-737
- Sindic A, Hirsch JR, Velic A, Piechota H und Schlatter E** (2005) Guanylin and uroguanylin regulate electrolyte transport in isolated human cortical collecting ducts. *Kidney Int* **67**: 1420-1427
- Sindic A, Schlatter E** (2005) Mechanisms of actions of guanylin peptides in the kidney. *Pflugers Arch* **450**: 283-291
- Sindic A, Velic A, Basoglu C, Hirsch JR, Edemir B, Kuhn M und Schlatter E** (2005) Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C. *Kidney Int* **68**: 1008-1017
- Sindice A, Basoglu C, Cerci A, Hirsch JR, Potthast R, Kuhn M, Ghanekar Y, Visweswariah SS und Schlatter E** (2002) Guanylin, uroguanylin, and heat-stable euterotoxin activate guanylate cyclase C and/or a pertussis toxin-sensitive G protein in human proximal tubule cells. *J Biol Chem* **277**: 17758-17764
- Singh S, Singh G, Heim JM und Gerzer R** (1991) Isolation and expression of a guanylate cyclase-coupled heat stable enterotoxin receptor cDNA from a human colonic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **179**: 1455-1463
- Skelton NJ, Garcia KC, Goeddel DV, Quan C und Burnier JP** (1994) Determination of the solution structure of the peptide hormone guanylin: observation of a novel form of topological stereoisomerism. *Biochemistry* **33**: 13581-13592
- Sklenar V, Piotto M, Leppik R und Saudek V** (1993) Gradient-tailored water suppression for <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity. *J Magn Reson* **102**: 241-245
- Snook AE, Stafford BJ, Li P, Tan G, Huang L, Birbe R, Schulz S, Schnell MJ, Thakur M, Rothstein JL, Eisenlohr LC und Waldman SA** (2008) Guanylyl cyclase C-induced immunotherapeutic responses opposing tumor metastases without autoimmunity. *J Natl Cancer Inst* **100**: 950-961
- So M, McCarthy BJ** (1980) Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 4011-4015
- Solov'eva OV, Kakuev DL, Gibanova NV und Lipkin VM** (2000) Deletion mutants of the natriuretic peptide receptor type B: expression of cDNA, purification and characteristics of proteins. *Bioorg Khim* **26**: 433-441

- Spangler BD** (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* **56**: 622-647
- Staples SJ, Asher SE und Giannella RA** (1980) Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of *E. coli* pathogenic for man. *J Biol Chem* **255**: 4716-4721
- States DJ, Haberkorn RA und Ruben DJ** (1982) A two-dimensional nuclear overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J Magn Reson* **48**: 286-292
- Steinbrecher KA, Harmel-Laws E, Garin-Laflam MP, Mann EA, Bezerra LD, Hogan SP und Cohen MB** (2011) Murine guanylate cyclase C regulates colonic injury and inflammation. **186**: 7205-7214
- Steinbrecher KA, Mann EA, Giannella RA und Cohen MB** (2001) Increases in guanylin and uroguanylin in a mouse model of osmotic diarrhea are guanylate cyclase C-independent. *Gastroenterology* **121**: 1191-1202
- Steinbrecher KA, Wowk SA, Rudolph JA, Witte DP und Cohen MB** (2002) Targeted inactivation of the mouse guanylin gene results in altered dynamics of colonic epithelial proliferation. *Am J Pathol* **161**: 2169-2178
- Swenson ES, Mann EA, Jump ML und Giannella RA** (1999) Hepatocyte nuclear factor-4 regulates intestinal expression of the guanylin/heat-stable toxin receptor. *Am J Physiol* **276**: G728-36
- Synergy Pharmaceuticals, Inc.** Study SP304-20210: a randomized, 12-week, double-blind, placebo-controlled, repeat-dose, oral, dose-ranging study to assess the safety and efficacy of plecanatide in patients with chronic idiopathic constipation. **In:** ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Verfügbar unter: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01429987> (**Identifier: NCT01429987**)
- Takahashi H, Shimada I** (2010) Production of isotopically labeled heterologous proteins in non-*E. coli* prokaryotic and eukaryotic cells. *J Biomol NMR* **46**: 3-10
- Takao T, Shimonishi Y, Kobayashi M, Nishimura O, Arita M, Takeda T, Honda T und Miwatani T** (1985) Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *Vibrio cholerae* non-01. *FEBS Lett* **193**: 250-254
- Takao T, Tominaga N, Shimonishi Y, Hara S, Inoue T und Miyama A** (1984) Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Biochem Biophys Res Commun* **125**: 845-851
- Takeda T, Peina Y, Ogawa A, Dohi S, Abe H, Nair GB und Pal SC** (1991) Detection of heat-stable enterotoxin in a cholera toxin gene-positive strain of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol Lett* **64**: 23-27
- Talluri S, Wagner G** (1996) An optimized 3D NOESY-HSQC. *J Magn Reson B* **112**: 200-205
- Thelin WR, Hodson CA und Milgram SL** (2005) Beyond the brush border: NHERF4 blazes new NHERF turf. *J Physiol* **567**: 13-19
- Thompson DK, Garbers DL** (1995) Dominant negative mutations of the guanylyl cyclase-A

receptor. Extracellular domain deletion and catalytic domain point mutations. *J Biol Chem* **270**: 425-430

**Thorpe DS, Garbers DL** (1989) The membrane form of guanylate cyclase. Homology with a subunit of the cytoplasmic form of the enzyme. *J Biol Chem* **264**: 6545-6549

**Tian X, Michal AM, Li P, Wolfe HR, Waldman SA und Wickstrom E** (2008) STa peptide analogs for probing guanylyl cyclase C. *Biopolymers* **90**: 713-723

**Tidten N** (2003) Klonierung und Charakterisierung von miniGC-C, einem Fragment der extrazellulären Domäne der Guanylatzyklase-C. Diplomarbeit, Universität Bayreuth

**Tkacz JS, Lampen O** (1975) Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* **65**: 248-257

**Tousson A, Fuller CM und Benos DJ** (1996) Apical recruitment of CFTR in T-84 cells is dependent on cAMP and microtubules but not Ca<sup>2+</sup> or microfilaments. *J Cell Sci* **109 ( Pt 6)**: 1325-1334

**Turner SM, Chaudhuri RR, Jiang ZD, DuPont H, Gyles C, Penn CW, Pallen MJ und Henderson IR** (2006) Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of different evolutionary lineages. *J Clin Microbiol* **44**: 4528-4536

**Urbanski R, Carrithers SL und Waldman SA** (1995) Internalization of *E. coli* ST mediated by guanylyl cyclase C in T84 human colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* **1245**: 29-36

**Ushkaryov YA, Hata Y, Ichtchenko K, Moomaw C, Afendis S, Slaughter CA und Sudhof TC** (1994) Conserved domain structure of beta-neurexins. Unusual cleaved signal sequences in receptor-like neuronal cell-surface proteins. *J Biol Chem* **269**: 11987-11992

**Vaandrager AB, Bot AG und De Jonge HR** (1997a) Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology* **112**: 437-443

**Vaandrager AB, Bot AG, Ruth P, Pfeifer A, Hofmann F und De Jonge HR** (2000) Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. *Gastroenterology* **118**: 108-114

**Vaandrager AB, Schulz S, De Jonge HR und Garbers DL** (1993) Guanylyl cyclase C is an N-linked glycoprotein receptor that accounts for multiple heat-stable enterotoxin-binding proteins in the intestine. *J Biol Chem* **268**: 2174-2179

**Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC, Houtsmuller AB, Ehlert EM, Bot AG, Edixhoven M, Boomaars WE, Lohmann SM und de Jonge HR** (1998) Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1466-1471

**Vaandrager AB, Tilly BC, Smolenski A, Schneider-Rasp S, Bot AG, Edixhoven M, Scholte BJ, Jarchau T, Walter U, Lohmann SM, Poller WC und de Jonge HR** (1997b) cGMP stimulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels co-expressed with cGMP-dependent protein kinase type II but not type Ib. *J Biol Chem* **272**: 4195-4200

- Vaandrager AB, van der Wiel E und de Jonge HR** (1993) Heat-stable enterotoxin activation of immunopurified guanylyl cyclase C. Modulation by adenine nucleotides. *J Biol Chem* **268**: 19598-19603
- Vaandrager AB, van der Wiel E, Hom ML, Luthjens LH und de Jonge HR** (1994) Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. *J Biol Chem* **269**: 16409-16415
- van den Akker F** (2001) Structural insights into the ligand binding domains of membrane bound guanylyl cyclases and natriuretic peptide receptors. *J Mol Biol* **311**: 923-937
- van den Akker F, Zhang X, Miyagi M, Huo X, Misono KS und Yee VC** (2000a) Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor. *Nature* **406**: 101-104
- van den Akker F, Zhang X, Miyagi M, Huo X, Misono KS und Yee VC** (2000b) Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor. *Nature* **406**: 101-104
- Verwecken W, Callewaert N, Kaigorodov V, Geysens S, Contreras R** (2007) Modification of the N-Glycosylation Pathway to Produce Homogenous, Human-like Glycans Using GlycoSwitch Plasmids. In: Cregg JM (ed), *Pichia Protocols*, 2nd Edition, Methods in Molecular Biology, Vol. 389. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, S. 119-138
- Vijayachandra K, Guruprasad M, Bhandari R, Manjunath UH, Somesh BP, Srinivasan N, Suguna K und Visweswariah SS** (2000) Biochemical characterization of the intracellular domain of the human guanylyl cyclase C receptor provides evidence for a catalytically active homotrimer. *Biochemistry* **39**: 16075-16083
- Wada A, Hasegawa M, Matsumoto K, Niidome T, Kawano Y, Hidaka Y, Padilla PI, Kurazono H, Shimonishi Y und Hirayama T** (1996) The significance of Ser1029 of the heat-stable enterotoxin receptor (STaR): relation of STa-mediated guanylyl cyclase activation and signaling by phorbol myristate acetate. *FEBS Lett* **384**: 75-77
- Waldman SA, Barber M, Pearlman J, Park J, George R und Parkinson SJ** (1998) Heterogeneity of guanylyl cyclase C expressed by human colorectal cancer cell lines *in vitro*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**: 505-514
- Waldman SA, Hyslop T, Schulz S, Barkun A, Nielsen K, Haaf J, Bonaccorso C, Li Y und Weinberg DS** (2009) Association of GUCY2C expression in lymph nodes with time to recurrence and disease-free survival in pN0 colorectal cancer. *JAMA* **301**: 745-752
- Waldman SA, O'Hanley P** (1989) Influence of a glycine or proline substitution on the functional properties of a 14-amino-acid analog of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* **57**: 2420-2424
- Wardlaw T, Salama P, Brocklehurst C, Chopra M und Mason E** (2010) Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *Lancet* **375**: 870-872
- Weiglmeier PR, Berkner H, Seebahn A, Vogel N, Schreiber R, Wohrl BM, Schwarzingen S und Rösch P** (2013) Prosequence switching: An effective strategy to produce biologically active *E. coli* heat-stable enterotoxin STh. *J Biomol Struct Dyn*, doi: 10.1080/07391102.2013.825758
- Weiglmeier PR, Rösch P und Berkner H** (2010) Cure and Curse: *E. coli* Heat-stable Enterotoxin



and Its Receptor Guanylyl Cyclase C. *Toxins* **2**: 2213-2229

**Weirich B** (2009) Die extrazelluläre Domäne der humanen Guanylat Zykklase C. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.

**Weissman JS, Kim PS** (1992) The pro region of BPTI facilitates folding. *Cell* **71**: 841-851

**Wenneras C, Erling V** (2004) Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhoea and carrier state in the developing world. *J Health Popul Nutr* **22**: 370-382

**Whitaker TL, Steinbrecher KA, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA und Cohen MB** (1997) The uroguanylin gene (Guca1b) is linked to guanylin (Guca2) on mouse chromosome 4. *Genomics* **45**: 348-354

**WHO** (2006) Future directions for research on enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines for developing countries. *Wkly Epidemiol Rec* **81**: 97-104

**Wilson EM, Chinkers M** (1995) Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry* **34**: 4696-4701

**Wishart DS, Bigam CG, Holm A, Hodges RS und Sykes BD** (1995) <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J Biomol NMR* **5**: 67-81

**Witek ME, Nielsen K, Walters R, Hyslop T, Palazzo J, Schulz S und Waldman SA** (2005) The putative tumor suppressor Cdx2 is overexpressed by human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* **11**: 8549-8556

**Wolf MK** (1997) Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **10**: 569-584

**Wolfe HR, Mendizabal M, Leong E, Cuthbertson A, Desai V, Pullan S, Fujii DK, Morrison M, Pither R und Waldman SA** (2002) *In vivo* imaging of human colon cancer xenografts in immunodeficient mice using a guanylyl cyclase C--specific ligand. *J Nucl Med* **43**: 392-399

**Wolfe HR, Waldman SA** (2002) A comparative molecular field analysis (COMFA) of the structural determinants of heat-stable enterotoxins mediating activation of guanylyl cyclase C. *J Med Chem* **45**: 1731-1734

**Wong SK, Ma CP, Foster DC, Chen AY und Garbers DL** (1995) The guanylyl cyclase-A receptor transduces an atrial natriuretic peptide/ATP activation signal in the absence of other proteins. *J Biol Chem* **270**: 30818-30822

**Wood LV, Ferguson LE, Hogan P, Thurman D, Morgan DR, DuPont HL und Ericsson CD** (1983) Incidence of bacterial enteropathogens in foods from Mexico. *Appl Environ Microbiol* **46**: 328-332

**Wu CJ, Hsueh PR und Ko WC** (2011) A new health threat in Europe: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 infections. *J Microbiol Immunol Infect* **44**: 390-393

**Wüthrich K** (1986) NMR of Proteins and Nucleic Acids. John Wiley & Sons, New York

- Yamanaka H, Fuke Y, Hitotsubashi S, Fujii Y und Okamoto K** (1993) Functional properties of pro region of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Microbiol Immunol **37**: 195-205
- Yamanaka H, Kameyama M, Baba T, Fujii Y und Okamoto K** (1994) Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I: requirement of DsbA for disulfide bond formation. J Bacteriol **176**: 2906-2913
- Yamanaka H, Nomura T, Fujii Y und Okamoto K** (1997) Extracellular secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I across the outer membrane. J Bacteriol **179**: 3383-3390
- Yamasaki S, Hidaka Y, Hideaki I, Takeda Y und Shimonishi Y** (1988) Structural Requirements for the Spatial Structure and Toxicity of Heat-Stable Enterotoxin (ST<sub>h</sub>) of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Bull Chem Soc Jpn **61**: 1701-1706
- Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe TX, Sakakibara S und Goto K** (1988) Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. Proc Natl Acad Sci U S A **85**: 6964-6967
- Yang Y, Gao Z, Guzman-Verduzco LM, Tachias K und Kupersztoch YM** (1992) Secretion of the STA3 heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: extracellular delivery of Pro-STA is accomplished by either Pro or STA. Mol Microbiol **6**: 3521-3529
- Yao Y, Wang J, Viroonchatapan N, Samson A, Chill J, Rothe E, Anglister J und Wang ZZ** (2002) Yeast expression and NMR analysis of the extracellular domain of muscle nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. J Biol Chem **277**: 12613-12621
- Yoshimura S, Ikemura H, Watanabe H, Aimoto S, Shimonishi Y, Hara S, Takeda T, Miwatani T und Takeda Y** (1985) Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEBS Lett **181**: 138-142
- Zhang W, Zhang C, Francis DH, Fang Y, Knudsen D, Nataro JP und Robertson DC** (2010) Genetic fusions of heat-labile (LT) and heat-stable (ST) toxoids of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* elicit neutralizing anti-LT and anti-STa antibodies. Infect Immun **78**: 316-325

## 8.2 Eigene Veröffentlichungen

- Weiglmeier PR, Rösch P und Berkner H** (2010) Cure and Curse: *E. coli* Heat-stable Enterotoxin and Its Receptor Guanylyl Cyclase C. Toxins **2**: 2213-2229
- Rösch P, Weiglmeier P und Berkner H.** Method for producing multiple recombinant disulfide bridged peptides. Schutzrecht EP2548882 A1 (23.01.2013), ALNuMed UG (haftungsbeschränkt), Pr.: DE20111008075 07.01.2011
- Weiglmeier PR, Berkner H, Seebahn A, Vogel N, Schreiber R, Wohrl BM, Schwarzingen S und Rösch P** (2013) Prosequence switching: An effective strategy to produce biologically active *E. coli* heat-stable enterotoxin STh. J Biomol Struct Dyn, doi: 10.1080/07391102.2013.825758

## 9 Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AmpR	Ampicillinresistenz
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinchoninsäure
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BMGY	<i>buffered glycerol complex medium</i>
BMMY	<i>buffered methanol complex medium</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Circulardichroismus
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
cGMP	3',5'-zyklisches Guanosinmonophosphat
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
Da	Dalton
deg	Grad
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ECD	extrazelluläre Domäne (von GC-C)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
FBS	fetales Rinderserum

FID	freier Induktionsabfall
GC-A	Guanylatzyklase A / ANP-Rezeptor
GC-B	Guanylatzyklase B / CNP-Rezeptor
GC-C	Guanylatzyklase C / STh-Rezeptor
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
GTP	Guanosintriphosphat
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlated spectroscopy</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
KHD	Kinase-Homologie-Domäne (von GC-C)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KmR	Kanamycinresistenz / Geneticinresistenz
LB	Luria-Bertani (Medium)
M	Mol pro Liter
M9	M9-Minimalmedium
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight</i>
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MD	<i>minimal dextrose medium</i>
MM	<i>minimal methanol medium</i>
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau Tetrazoliumchlorid
NHE-3	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher 3
NMR	kernmagnetische Resonanz
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
NPR-C	<i>natriuretic peptide clearance receptor</i>
NRXN	Neurexin
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG-II	cGMP-abhängige Proteinkinase II

<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP-HPLC	<i>reversed phase high-performance liquid chromatography</i>
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylphosphat
STa	hitze stabiles Enterotoxin aus <i>E. coli</i>
STh	von <i>E. coli</i> in Menschen gebildetes STa
STp	von <i>E. coli</i> in Schweinen gebildetes STa
Tab.	Tabelle
TetR	Tetracyclinresistenz
TD	Zahl der komplexen Datenpunkte
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMD	Transmembrandomäne (von GC-C)
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
Trx	Thioredoxin (frei oder als Fusionsanhang)
UV	ultraviolett
v/v	Volumen je Volumen
$\omega$	Frequenz
w/v	Gewicht je Volumen
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose medium</i>

## 10 Anhang

### 10.1 Sequenzen der verwendeten Plasmide

Im Folgenden sind DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten bzw. konstruierten Plasmide angegeben. Dabei handelt es sich in der Regel um die für das jeweiligen Zielprotein kodierenden Bereiche sowie benachbarte Sequenzen. Zusätzlich sind jeweils die zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen angegeben.

#### 10.1.1 pET32a-Asp-pres-prouroguanylin

Die Prosequenz von Prouroguanylin ist hellgrau und die Hormonsequenz schwarz unterlegt.

```

1  aaagagttcc tgcacgctaa cctggccggt tctggttctg gccatatgca ccatcatcat
   k e f l d a n l a g s g s g h m h h h h

61  catcattctt ctggctcgtt gccacgcggt tctggatatga aagaaaccgc tgctgctaaa
   h h s s g l v p r g s g m k e t a a a k

                                BglIII
                                +-+-----
121  ttccaacgcc agcacatgga cagcccagat ctgggtgacg acgacgacga cctggaagtt
   f e r q h m d s p d l g d d d d d l e v

181  ctgttccagg gtccggttta catccagtag cagggtttcc gtgttcagct ggaatccatg
   l f q g p v y i q y q g f r v q l e s m

241  aaaaaactgt cgcacctgga agctcagtgg gctccgtccc cgcgtctgca ggctcagttc
   k k l s d l e a q w a p s p r l q a q s

301  ctgctgccgg ctgtttgcca ccaccgggt ctgccgcagg acctgcagcc ggtttgcgct
   l l p a v c h h p a l p q d l q p v c a

361  tcccaggaag cttcctccat cttcaaaacc ctgcgtacca tcgctaacga cgactgcgaa
   s q e a s s i f k t l r t i a n d d c e

                                NcoI
                                +-+-----
421  ctgtgcgtta acgttgcttg caccgggttg ctgtaaccat ggctgatata g
   l c v n v a c t g c l - p w l i s

```

#### 10.1.2 pET32a-Asp-pres-Prouro-STh

Die Prosequenz von Prouro-STh ist hellgrau und die Hormonsequenz schwarz unterlegt.

```

1  aaagagttcc tcgacgctaa cctgggccggt tctggttctg gccatatgca ccatcatcat
   k e f l d a n l a g s g s g h m h h h h

61  catcattctt ctggctctggt gccacgcggt tctggatatga aagaaaccgc tgctgctaaa
   h h s s g l v p r g s g m k e t a a a k

121  ttcgaacgcc agcacatgga cagcccagat ctgggtgacg acgacgacga cctggaagtt
   f e r q h m d s p d l g d d d d d l e v

181  ctgttccagg gtccggttta catccagtac cagggtttcc gtgttcagct ggaatccatg
   l f q g p v y i q y q g f r v q l e s m

241  aaaaaactgt ccgacctgga agctcagtgg gctccgtccc cgcgctctgca ggctcagtcc
   k k l s d l e a q w a p s p r l q a q s

301  ctgctgccgg ctgtttgcca ccaccggct ctgccgcagg acctgcagcc ggtttgcgct
   l l p a v c h h p a l p q d l q p v c a

      HindIII
      +-+-----
361  tcccaggaag cttcctccat cttcaaaacc ctgcgtaaca gcagcaacta ttgctgcgaa
   s q e a s s i f k t l r n s s n y c c e

                                   XhoI
                                   +-+-----
421  ctgtgctgca acccggcgtg caccggctgc tattaactcg agcaccacca c
   l c c n p a c t g c y - l e h h h

```

### 10.1.3 pET32a-Asp-pres-Prouro-STh-L78Y

Die Prosequenz von Prouro-STh ist hellgrau und die Hormonsequenz schwarz unterlegt.

```

1  aaagagttcc tcgacgctaa cctgggccggt tctggttctg gccatatgca ccatcatcat
   k e f l d a n l a g s g s g h m h h h h

61  catcattctt ctggctctggt gccacgcggt tctggatatga aagaaaccgc tgctgctaaa
   h h s s g l v p r g s g m k e t a a a k

121  ttcgaacgcc agcacatgga cagcccagat ctgggtgacg acgacgacga cctggaagtt
   f e r q h m d s p d l g d d d d d l e v

181  ctgttccagg gtccggttta catccagtac cagggtttcc gtgttcagct ggaatccatg
   l f q g p v y i q y q g f r v q l e s m

241  aaaaaactgt ccgacctgga agctcagtgg gctccgtccc cgcgctctgca ggctcagtcc
   k k l s d l e a q w a p s p r l q a q s

301  ctgctgccgg ctgtttgcca ccaccggct ctgccgcagg acctgcagcc ggtttgcgct
   l l p a v c h h p a l p q d l q p v c a

361  tcccaggaag cttcctccat cttcaaaacc ctgcgtaaca gcagcaacta ttgctgcgaa
   s q e a s s i f k t l r n s s n y c c e

421  tattgctgca acccggcgtg caccggctgc tattaactcg agcaccacca ccac

```

y c c n p a c t g c y - l e h h h h

#### 10.1.4 pET32a-Asp-pres-Prouro-STh-Y74R-L78Y

Die Prosequenz von Prouro-STh ist hellgrau und die Hormonsequenz schwarz unterlegt.

```

1  aaagagttcc tgcacgctaa cctggccggt tctggttctg gccatatgca ccatcatcat
   k e f l d a n l a g s g s g h m h h h h

61  catcattctt ctggctctggt gccacgcggt tctggatatga aagaaaccgc tgctgctaaa
   h h s s g l v p r g s g m k e t a a a k

121  ttcgaacgcc agcacatgga cagcccagat ctgggtgacg acgacgacga cctggaagtt
   f e r q h m d s p d l g d d d d d l e v

181  ctgttccagg gtccggttta catccagtag cagggtttcc gtgttcagct ggaatccatg
   l f q g p v y i q y q g f r v q l e s m

241  aaaaaactgt ccgacctgga agctcagtag gctccgtccc cgcgctctgca ggctcagttc
   k k l s d l e a q w a p s p r l q a q s

301  ctgctgccgg ctgtttgcca ccaccgggt ctgccgcagg acctgcagcc ggtttgcgct
   l l p a v c h h p a l p q d l q p v c a

361  tcccaggaag cttcctccat cttcaaaacc ctgcgtaaca gcagctaccg ttgctgcgaa
   s q e a s s i f k t l r n s s y r c c e

421  tattgctgca acccggcgtg caccggctgc tattaactcg agcaccacca ccac
   y c c n p a c t g c y - l e h h h h

```

#### 10.1.5 pET32a-Asp-pres-prouroguanylin-A72R-D75E

Die Prosequenz von Prouro-STh ist hellgrau und die Hormonsequenz schwarz unterlegt.

```

1  aaagagttcc tgcacgctaa cctggccggt tctggttctg gccatatgca ccatcatcat
   k e f l d a n l a g s g s g h m h h h h

61  catcattctt ctggctctggt gccacgcggt tctggatatga aagaaaccgc tgctgctaaa
   h h s s g l v p r g s g m k e t a a a k

121  ttcgaacgcc agcacatgga cagcccagat ctgggtgacg acgacgacga cctggaagtt
   f e r q h m d s p d l g d d d d d l e v

181  ctgttccagg gtccggttta catccagtag cagggtttcc gtgttcagct ggaatccatg
   l f q g p v y i q y q g f r v q l e s m

241  aaaaaactgt ccgacctgga agctcagtag gctccgtccc cgcgctctgca ggctcagttc
   k k l s d l e a q w a p s p r l q a q s

301  ctgctgccgg ctgtttgcca ccaccgggt ctgccgcagg acctgcagcc ggtttgcgct

```



```

      l l p a v c h h p a l p q d l q p v c a
361  tcccaggaag cttcctccat cttcaaaacc ctgcgtacca tccgtaacga cgaatgcgaa
      s q e a s s i f k t l r t i r n d e c e
421  ctgtgcgtta acgttgcttg caccggttgc ctgtaaccat ggctg
      l c v n v a c t g c l - p w l

```

### 10.1.6 pET32a-Asp-pres-prouroguanylin- $\Delta$ (70-72)-D75E

Die Prosequenz von Prouro-STh ist hellgrau und die Hormonsequenz schwarz unterlegt.

```

      1  aaagagttcc tgcacgctaa cctggccggt tctggttctg gccatatgca ccatcatcat
          k e f l d a n l a g s g s g h m h h h h
61  catcattctt ctggtctggt gccacgcggt tctggtatga aagaaaccgc tgctgctaaa
          h h s s g l v p r g s g m k e t a a a k
121  ttgaacgcc agcacatgga cagcccagat ctgggtgacg acgacgacga cctggaagtt
          f e r q h m d s p d l g d d d d d l e v
181  ctgttccagg gtccggttta catccagtac cagggtttcc gtgttcagct ggaatccatg
          l f q g p v y i q y q g f r v q l e s m
241  aaaaaactgt ccgacctgga agctcagtgg gctccgtccc cgcgctctgca ggctcagtcc
          k k l s d l e a q w a p s p r l q a q s
301  ctgctgccgg ctgtttgcca ccaccggct ctgccgcagg acctgcagcc ggtttgcgct
          l l p a v c h h p a l p q d l q p v c a
361  tcccaggaag cttcctccat cttcaaaacc ctgcgtaacg acgaatgcga actgtgcgtt
          s q e a s s i f k t l r n d e c e l c v
421  aacgttgctt gcaccggttg cctgtaacca tggctgatat cggat
          n v a c t g c l - p w l i s d

```

### 10.1.7 pET43.1a-NusA-C489A-miniGC-C

Die Aminosäuresequenz von MiniGC-C sowie die C489A-Mutation in NusA sind hellgrau unterlegt.

```

      1  gctgcccgt aatattgcctg gttcgggtgac gaagcgacta gtggttctgg tcatcaccat
          a a r n i a w f g d e a t s g s g h h h
61  caccatcact ccgcgggtaa agaaaccgct gctgcgaaat ttgaacgcc a gcacatggac
          h h h s a g k e t a a a k f e r q h m d

```

SmaI  
---+---

```

121  tcgccaccgc caactggtct ggtcccccg ggcagcgcgc tggaagtgct gtttcagggt
      s p p p t g l v p r g s a l e v l f q g

181  ccgagcccg cgcgtaaaact gatgtatttc ctggtgaact tctggaaaac caacgatctg
      p s p a r k l m y f l v n f w k t n d l

241  ccgttcaaaa cctatagctg gagcaccagc tacgtttata aaaacggcac cgaaaccgaa
      p f k t y s w s t s y v y k n g t e t e

301  gattgcttct ggtatctgaa tgcgctggaa gcgagcggtta gctatttttag ccacgaactg
      d c f w y l n a l e a s v s y f s h e l

361  ggctttaaag tgggtgctgcg ccaggataaa gaatttcagg acatcctgat ggatcataac
      g f k v v l r q d k e f q d i l m d h n

421  cgcaaaagca acgtgatcat tatgtgcggc ggtccggaat ttctgtacaa actgaaaggc
      r k s n v i i m c g g p e f l y k l k g

481  gatcgtgcgg ttgcggaaga tattgtgata atcctgggtg acctgttcaa cgatcagtac
      d r a v a e d i v i i l v d l f n d q y

541  ctgaaagata atgttaccgc gccggattat atgaaaaacg ttctgggtgct gaccctggcg
      l k d n v t a p d y m k n v l v l t l a

601  ccgggtgata cgatggttct gctgtatacc agcgtggata ccaaaaaata taaagttctg
      p g d t m v l l y t s v d t k k y k v l

661  ctgacctacg atacctatgt gaacaaaacc taccggttg atatgagccc gaccttcacc
      l t y d t h v n k t y p v d m s p t f t

721  tggaaaaaca gcaaactgcc gaacgatatc accggtcgtg gcccgagta ataagtcgac
      w k n s k l p n d i t g r g p q - - v d

      BamHI
      -+-----
781  ggatccgaat tc
      g s e f

```

### 10.1.8 pET32a-ECD-GC-C

Die Aminosäuresequenz von ECD-GC-C ist hellgrau unterlegt.

```

1  gccatggctc tggaagtgct gtttcagggt ccgagccagg ttagccagaa ctgccataac
      a m a l e v l f q g p s q v s q n c h n

61  ggcagctatg aaatcagcgt gctgatgatg ggtaatagcg cgtttgcgga accgctgaaa
      g s y e i s v l m m g n s a f a e p l k

121  aatctggaag atgcggtgaa cgaaggcctg gaaattgttc gcggtcgtct gcagaatgcg
      n l e d a v n e g l e i v r g r l q n a

181  ggtctgaatg tgaccgtgaa cgcgaccttt atgtatagcg atggcctgat tcataacagc
      g l n v t v n a t f m y s d g l i h n s

```

241 ggtgattgtc gtagcagcac ctgtgaaggt ctggatctgc tgcgcaaaat tagcaatgcg  
g d c r s s t c e g l d l l r k i s n a

301 cagcgtatgg gttgtgttct gattgggtccg agctgtacct atagcacctt ccagatgtac  
q r m g c v l i g p s c t y s t f q m y

361 ctggataccg aactgagcta tccgatgatt agcgcgggta gctttggtct gagctgcgat  
l d t e l s y p m i s a g s f g l s c d

421 taaaaagaaa cctgacccg tctgatgagc cggcgcgta aactgatgta tttcctggtg  
y k e t l t r l m s p a r k l m y f l v

481 aacttctgga aaaccaacga tctgccgttc aaaacctata gctggagcac cagctacgtt  
n f w k t n d l p f k t y s w s t s y v

541 tataaaaaacg gcaccgaaac cgaagattgc ttctggtatc tgaatgcgct ggaagcgagc  
y k n g t e t e d c f w y l n a l e a s

601 gttagctatt ttagccacga actgggcttt aaagtgggtgc tgcgccagga taaagaattt  
v s y f s h e l g f k v v l r q d k e f

661 caggacatcc tgatggatca taaccgcaaa agcaacgtga tcattatgtg cggcgggtccg  
q d i l m d h n r k s n v i i m c g g p

721 gaatttctgt acaaactgaa aggcgatcgt gcggttgcgg aagatattgt gatcatcctg  
e f l y k l k g d r a v a e d i v i i l

781 gttgacctgt tcaacgatca gtacctggaa gataatgtta cgcgcgcgga ttatatgaaa  
v d l f n d q y l e d n v t a p d y m k

841 aacgttctgg tgctgaccct gagcccgggt aatagcctgc tgaacagcag ctttagccgt  
n v l v l t l s p g n s l l n s s f s r

901 aatctgagcc cgaccaaacg tgattttgcg ctggcgtatc tgaatggcat tctgctgttt  
n l s p t k r d f a l a y l n g i l l f

961 ggccacatgc tgaaaatctt tctggaaaac ggcgaaaaca ttaccacccc gaaatttgcg  
g h m l k i f l e n g e n i t t p k f a

1021 catgcgtttc gcaacctgac cttcgaaggt tatgatggtc cggttaccct ggatgattgg  
h a f r n l t f e g y d g p v t l d d w

1081 ggcgatgttg atagcacgat ggtgctgctg tataccagcg tggataccaa aaaatataaa  
g d v d s t m v l l y t s v d t k k y k

1141 gttctgctga cctacgatac ccatgtgaac aaaacctacc cggttgatat gagcccgacc  
v l l t y d t h v n k t y p v d m s p t

1201 ttcacctgga aaaacagcaa actgccgaac gatatcaccg gtcgtggccc gcagtaataa  
f t w k n s k l p n d i t g r g p q - -

1261 gtcgacggat ccg  
v d g s

### 10.1.9 pET43.1a-NusA-Cys<sup>-</sup>-ECD-GC-C

Die Aminosäuresequenz von ECD-GC-C und die C → A Mutationen in NusA-Cys<sup>-</sup> sind hellgrau unterlegt.

```

1  atgaacaaag aaattttggc tgtagttgaa gccgtatcca atgaaaaggc gctacctcgc
   m n k   e i l   a v v e   a v s   n e k   a l p r

61  gagaagattt tcgaagcatt ggaaagcgcg ctggcgacag caacaaagaa aaaatatgaa
   e k i   f e a   l e s a   l a t   a t k   k k y e

121 caagagatcg acgtccgcgt acagatcgat cgcaaaagcg gtgattttga cactttccgt
    q e i   d v r   v q i d   r k s   g d f   d t f r

181 cgctggttag ttgttgatga agtcacccag cggaccaagg aaatcaccct tgaagccgca
    r w l   v v d   e v t q   p t k   e i t   l e a a

241 cgttatgaag atgaaagcct gaacctgggc gattacgttg aagatcagat tgagtctggt
    r y e   d e s   l n l g   d y v   e d q   i e s v

301 acctttgacc gtatcactac ccagacggca aaacagggtta tcgtgcagaa agtgcgtgaa
    t f d   r i t   t q t a   k q v   i v q   k v r e

361 gccgaacgtg cgatggtggt tgatcagttc cgtgaacacg aaggtgaaat catcacgggc
    a e r   a m v   v d q f   r e h   e g e   i i t g

421 gtggtgaaaa aagtaaaccg cgacaacatc tctctggatc tgggcaacaa cgctgaagcc
    v v k   k v n   r d n i   s l d   l g n   n a e a

481 gtgatcctgc gcgaagatat gctgccgcgt gaaaacttcc gccctggcga ccgcgttcgt
    v i l   r e d   m l p r   e n f   r p g   d r v r

541 ggcgtgctct attccgttcg cccggaagcg cgtggcgcgc aactgttcgt cactcgttcc
    g v l   y s v   r p e a   r g a   q l f   v t r s

601 aagccggaag tgctgatcga actgttcctg attgaagtgc cagaaatcgg cgaagaagtg
    k p e   m l i   e l f r   i e v   p e i   g e e v

661 attgaaatta aagcagcggc tcgcatccg ggttctcgtg cgaaaatcgc ggtgaaaacc
    i e i   k a a   a r d p   g s r   a k i   a v k t

721 aacgataaac gtatcgatcc ggtaggtgct gccgtaggta tgcggtggcg gcgtgttcag
    n d k   r i d   p v g a   a v g   m r g   a r v q

781 gcggtgtcta ctgaactggg tggcgagcgt atcgatatcg tcctgtggga tgataacccg
    a v s   t e l   g g e r   i d i   v l w   d d n p

841 gcgcagttcg tgattaacgc aatggcaccg gcagacgttg cttctatcgt ggtggatgaa
    a q f   v i n   a m a p   a d v   a s i   v v d e

901 gataaacaca ccatggacat cgccgttgaa gccggtaatc tggcgcagge gattggcgt
    d k h   t m d   i a v e   a g n   l a q   a i g r

961 aacggtcaga acgtgctgct ggcttcgcaa ctgagcgggt gggaactcaa cgtgatgacc
    n g q   n v r   l a s q   l s g   w e l   n v m t

1021 gttgacgacc tgcaagctaa gcatcaggcg gaagcgcacg cagcgatcga caccttcacc

```

v d d l q a k h q a e a h a a i d t f t  
 1081 aaatatctcg acatcgacga agacttcgcg actgttctgg tagaagaagg cttctcgacg  
 k y l d i d e d f a t v l v e e g f s t  
 1141 ctggaagaat tggcctatgt gccgatgaaa gagctgttgg aaatcgaagg ccttgatgag  
 l e e l a y v p m k e l l e i e g l d e  
 1201 ccgaccgttg aagcactgcg cgagcgtgct aaaaatgcac tggccaccat tgcacaggcc  
 p t v e a l r e r a k n a l a t i a q a  
 1261 caggaagaaa gcctcgggtga taacaaaccg gctgacgac tgctgaacct tgaaggggta  
 q e e s l g d n k p a d d l l n l e g v  
 1321 gatcgtgatt tggcattcaa actggccgcc cgtggcgttg ctacgctgga agatctcgcc  
 d r d l a f k l a a r g v a t l e d l a  
 1381 gaacagggca ttgatgatct ggctgatatc gaaggggttg ccgacgaaaa agccggagca  
 e q g i d d l a d i e g l t d e k a g a  
 1441 ctgattatgg ctgcccgtaa tattgcctgg ttccggtgacg aagcgactag tggttctggt  
 l i m a a r n i a w f g d e a t s g s g  
 1501 catcaccatc accatcactc cgcgggtaaa gaaaccgctg ctgcgaaatt tgaacgccag  
 h h h h h h s a g k e t a a a k f e r q  
 1561 cacatggact cgccaccgcc aactggctctg gtccccggg gcagcgcggg ttctggtacg  
 h m d s p p p t g l v p r g s a g s g t

*SacI*  
 -----+--

1621 attgatgacg acgacaagag tccgggagct cagcacatgg acagcccaga tcttgccatg  
 i d d d d k s p g a q h m d s p d l a m  
 1681 gctctggaag tgctgtttca ggggtccgagc caggtttagcc agaactgcca taacggcagc  
 a l e v l f q g p s q v s q n c h n g s  
 1741 tatgaaatca gcggtgctgat gatgggtaat agcgcgtttg cggaaccgct gaaaaatctg  
 y e i s v l m m g n s a f a e p l k n l  
 1801 gaagatgcgg tgaacgaagg cctggaaatt gttcgcggtc gtctgcagaa tgcgggtctg  
 e d a v n e g l e i v r g r l q n a g l  
 1861 aatgtgaccg tgaacgcgac ctttatgtat agcgatggcc tgattcataa cagcggtgat  
 n v t v n a t f m y s d g l i h n s g d  
 1921 tgtcgtagca gcacctgtga aggtctggat ctgctgcgca aaattagcaa tgcgcagcgt  
 c r s s t c e g l d l l r k i s n a q r  
 1981 atgggttggtg ttctgattgg tccgagctgt acctatagca ccttccagat gtacctggat  
 m g c v l i g p s c t y s t f q m y l d  
 2041 accgaactga gctatccgat gattagcgcg ggtagctttg gtctgagctg cgattacaaa  
 t e l s y p m i s a g s f g l s c d y k  
 2101 gaaaccctga cccgtctgat gagcccggcg cgtaaactga tgtatttctt ggtgaacttc  
 e t l t r l m s p a r k l m y f l v n f  
 2161 tggaaaacca acgatctgcc gttcaaaacc tatagctgga gcaccagcta cgtttataaa  
 w k t n d l p f k t y s w s t s y v y k

```

2221 aacggcaccg aaaccgaaga ttgcttctgg tatctgaatg cgctggaagc gagcggttagc
    n g t e t e d c f w y l n a l e a s v s

2281 tatttttagcc acgaactggg ctttaaagtg gtgctgcgcc aggataaaga atttcaggac
    y f s h e l g f k v v l r q d k e f q d

2341 atcctgatgg atcataaccg caaaagcaac gtgatcatta tgtgcgggcgg tccggaattt
    i l m d h n r k s n v i i m c g g p e f

2401 ctgtacaaac tgaaaggcga tcgtgcgggtt gcggaagata ttgtgatcat cctggttgac
    l y k l k g d r a v a e d i v i i l v d

2461 ctgttcaacg atcagtacct ggaagataat gttaccgcgc cggattatat gaaaaacgtt
    l f n d q y l e d n v t a p d y m k n v

2521 ctgggtgctga ccctgagccc gggtaatagc ctgctgaaca gcagcttttag ccgtaatctg
    l v l t l s p g n s l l n s s f s r n l

2581 agcccgacca aacgtgattt tgcgctggcg tatctgaatg gcattctgct gtttggccac
    s p t k r d f a l a y l n g i l l f g h

2641 atgctgaaaa tctttctgga aaacggcgaa aacattacca ccccgaaatt tgcgcatgcg
    m l k i f l e n g e n i t t p k f a h a

2701 tttcgcaacc tgaccttcga aggttatgat ggtccggtta ccctggatga ttggggcgat
    f r n l t f e g y d g p v t l d d w g d

2761 gttgatagca cgatggtgct gctgtatacc agcgtggata ccaaaaaata taaagttctg
    v d s t m v l l y t s v d t k k y k v l

2821 ctgacctacg atacccatgt gaacaaaacc taccgggttg atatgagccc gaccttcacc
    l t y d t h v n k t y p v d m s p t f t

2881 tggaaaaaca gcaaactgcc gaacgatatc accggctcgtg gcccgcagta ataagtcgac
    w k n s k l p n d i t g r g p q - - v d

      EcoRI
      +-+-----
2941 ggatccgaat tc
      g s e f

```

### 10.1.10 pPIC9K-ECD-GC-C-6xHis

Die Sekretionssignalsequenz ist schwarz unterlegt, die ECD-GC-C-Sequenz ist hellgrau.

```

1  atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct
    m r f p s i f t a v l f a a s s a l a a

61  ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt
    p v n t t t e d e t a q i p a e a v i g

121 tactcagatt tagaagggga tttcgatggt gctgttttgc cattttccaa cagcacaat
    y s d l e g d f d v a v l p f s n s t n

```

```

181  aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggta
    n g l l f i n t t i a s i a a k e e g v

      XhoI
    +------
241  tctctcgaga aaagagaggc tgaagctagc caggttagcc agaactgcca taacggcagc
    s l e k r e a e a s q v s q n c h n g s

301  tatgaaatca gcgctgtgat gatgggtaat agcgcgtttg cggaaccgct gaaaaatctg
    y e i s v l m m g n s a f a e p l k n l

361  gaagatgcgg tgaacgaagg cctggaaatt gttcgcggtc gtctgcagaa tgcgggtctg
    e d a v n e g l e i v r g r l q n a g l

421  aatgtgaccg tgaacgcgac ctttatgtat agcgatggcc tgattcataa cagcggtgat
    n v t v n a t f m y s d g l i h n s g d

481  tgtcgtagca gcacctgtga aggtctggat ctgctgcgca aaattagcaa tgcgcagcgt
    c r s s t c e g l d l l r k i s n a q r

541  atgggttggtg ttctgattgg tccgagctgt acctatagca ctttcagat gtacctggat
    m g c v l i g p s c t y s t f q m y l d

601  accgaactga gctatccgat gattagcgcg ggtagctttg gtctgagctg cgattacaaa
    t e l s y p m i s a g s f g l s c d y k

661  gaaacctga cccgtctgat gagcccggcg cgtaaactga tgtatttcct ggtgaacttc
    e t l t r l m s p a r k l m y f l v n f

721  tggaaaacca acgatctgcc gttcaaaacc tatagctgga gcaccagcta cgtttataaa
    w k t n d l p f k t y s w s t s y v y k

781  aacggcaccg aaaccgaaga ttgcttctgg tatctgaatg cgctggaagc gagcgttagc
    n g t e t e d c f w y l n a l e a s v s

841  tatttttagcc acgaactggg ctttaaagtg gtgctgcgcc aggataaaga atttcaggac
    y f s h e l g f k v v l r q d k e f q d

901  atcctgatgg atcataaccg caaaagcaac gtgatcatta tgtgcggcgg tccggaattt
    i l m d h n r k s n v i i m c g g p e f

961  ctgtacaaac tgaaaggcga tcgtgcgggtt gcggaagata ttgtgatcat cctgggtgac
    l y k l k g d r a v a e d i v i i l v d

1021 ctgttcaacg atcagtacct ggaagataat gttaccgcgc cggattatat gaaaaacggt
    l f n d q y l e d n v t a p d y m k n v

1081 ctgggtgctga ccctgagccc gggtaatagc ctgctgaaca gcagctttag ccgtaatctg
    l v l t l s p g n s l l n s s f s r n l

1141 agcccgacca aacgtgattt tgcgctggcg tatctgaatg gcattctgct gtttggccac
    s p t k r d f a l a y l n g i l l f g h

1201 atgctgaaaa tctttctgga aaacggcgaa aacattacca ccccgaaatt tgcgcatgcg
    m l k i f l e n g e n i t t p k f a h a

1261 tttcgcaacc tgaccttcca aggttatgat ggtccgggta ccctggatga ttggggcgat
    f r n l t f e g y d g p v t l d d w g d

1321 gttgatagca cgatggtgct gctgtatacc agcgtggata ccaaaaaata taaagttctg
    v d s t m v l l y t s v d t k k y k v l

```

```

1381  ctgacctacg atacccatgt gaacaaaacc taccggttg atatgagccc gaccttcacc
      l t y d t h v n k t y p v d m s p t f t

1441  tggaaaaaca gcaaactgcc gaacgatatc accggtcgtg gccgcagca ccaccatcac
      w k n s k l p n d i t g r g p q h h h h

      XhoI
      +-+-----
1501  caccactaac tcgag
      h h - l e

```

### 10.1.11 pCMV\_Nrxn-ECD-GC-C-Thr

Die NRNX-Sekretionssignalsequenz ist schwarz unterlegt. ECD-GC-C ist hellgrau und das gespleißte IgG ist dunkelgrau dargestellt.

```

1  atggggacgg cgctggtcca gcatgggggc tgctgtctcc tctgcctgtc gctgctgctg
   m g t a l v q h g g c c l l c l s l l l

      SalI
      +-+-----
61  ttgggctgct gggcagagct gggcagtggg gcgtcgacta gccaggttag ccagaactgc
   l g c w a e l g s g a s t s q v s q n c

121  cataacggca gctatgaaat cagcgtgctg atgatgggta atagcgcgtt tgcggaaccg
   h n g s y e i s v l m m g n s a f a e p

181  ctgaaaaatc tggaagatgc ggtgaacgaa ggccctggaaa ttgttcgcgg tcgtctgcag
   l k n l e d a v n e g l e i v r g r l q

241  aatgcgggtc tgaatgtgac cgtgaacgcg acctttatgt atagcgatgg cctgattcat
   n a g l n v t v n a t f m y s d g l i h

301  aacagcgggtg attgtcgtag cagcacctgt gaaggtctgg atctgctgcg caaaattagc
   n s g d c r s s t c e g l d l l r k i s

361  aatgcgcagc gtatgggttg tgttctgatt ggtccgagct gtacctatag caccttcacg
   n a q r m g c v l i g p s c t y s t f q

421  atgtacctgg ataccgaact gagctatccg atgattagcg cgggtagctt tggctctgagc
   m y l d t e l s y p m i s a g s f g l s

481  tgcgattaca aagaaaccct gaccgtctg atgagcccgg cgcgtaaact gatgtatttc
   c d y k e t l t r l m s p a r k l m y f

541  ctgggtgaact tctggaaaac caacgatctg ccgttcaaaa cctatagctg gagcaccagc
   l v n f w k t n d l p f k t y s w s t s

601  tacgtttata aaaacggcac cgaaaccgaa gattgcttct ggtatctgaa tgcgctggaa
   y v y k n g t e t e d c f w y l n a l e

661  gcgagcggtta gctatttttag ccacgaactg ggcttttaaag tgggtgctgcg ccaggataaa
   a s v s y f s h e l g f k v v l r q d k

```



721 gaatttcagg acatcctgat ggatcataac cgcaaaagca acgtgatcat tatgtgcggc  
e f q d i l m d h n r k s n v i i m c g

781 ggtccggaat ttctgtacaa actgaaaggc gatcgtgcgg ttgcggaaga tattgtgatc  
g p e f l y k l k g d r a v a e d i v i

841 atcctggttg acctgttcaa cgatcagtac ctggaagata atgttaccgc gccggattat  
i l v d l f n d q y l e d n v t a p d y

901 atgaaaaacg ttctggtgct gaccctgagc ccgggtaata gcctgctgaa cagcagcttt  
m k n v l v l t l s p g n s l l n s s f

961 agccgtaatc tgagcccgac caaacgtgat tttgcgctgg cgtatctgaa tggcattctg  
s r n l s p t k r d f a l a y l n g i l

1021 ctgtttggcc acatgctgaa aatctttctg gaaaacggcg aaaacattac caccgcgaaa  
l f g h m l k i f l e n g e n i t t p k

1081 tttgcgcatg cgtttcgcaa cctgaccttc gaaggttatg atggtcgggt taccctggat  
f a h a f r n l t f e g y d g p v t l d

1141 gattggggcg atgttgatag cacgatgggtg ctgctgtata ccagcgtgga taccaaaaaa  
d w g d v d s t m v l l y t s v d t k k

1201 tataaagttc tgctgacctc cgatacccat gtgaacaaaa cctaccgggt tgatatgagc  
y k v l l t y d t h v n k t y p v d m s

1261 ccgaccttca cctggaaaaa cagcaaaactg ccgaacgata tcaccggctg tggcccgag  
p t f t w k n s k l p n d i t g r g p q

*BamHI*  
--+-

1321 ctggtgccca gaggcagcga ggatcccgat cccgaggggtg agtactaagc ttcagcgctc  
l v p r g s e d p d p e g e y - a s a l

1381 ctgcctggac gcatcccggc tatgcagccc cagtccaggg cagcaaggca ggccccgtct  
l p g r i p a m q p q s r a a r q a p s

1441 gcctcttcac ccggaggcct ctgcccggcc cactcatgct cagggagagg gtcttctggc  
a s s p g g l c p p h s c s g r g s s g

1501 tttttcccca ggctctgggc aggcacaggc taggtgcccc taaccaggc cctgcacaca  
f f p r l w a g t g - v p l t q a l h t

1561 aaggggcagg tgctgggctc agacctgcca agagccatat ccgggaggac cctgcccctg  
k g q v l g s d l p r a i s g r t l p l

1621 acctaagccc accccaaagg ccaaactctc cactccctca gctcggacac cttctctcct  
t - a h p k g q t l h s l s s d t f s p

1681 ccagattcc agtaactccc aatcttctct ctgcagagcc caaatcttgt gacaaaactc  
p r f q - l p i f s l q s p n l v t k l  
p k s c d k t

1741 acacatgccc accgtgcccga ggtaagccag cccaggcctc gccctccagc tcaaggcggg  
t h a h r a q v s q p r p r p p a q g g  
h t c p p c p

1801 acaggtgccc tagagtagcc tgcattccagg gacaggcccc agccgggtgc tgacacgtcc  
t g a l e - p a s r d r p q p g a d t s

```

1861  acctccatct cttcctcagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc
      t s i s s s a p e l l g g p s v f l f p

1921  ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg
      p k p k d t l m i s r t p e v t c v v v

1981  gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg
      d v s h e d p e v k f n w y v d g v e v

2041  cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc
      h n a k t k p r e e q y n s t y r v v s

2101  gtcctcaccg tcttgaccca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc
      v l t v l h q d w l n g k e y k c k v s

2161  aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg tgggaccggt
      n k a l p a p i e k t i s k a k g g t r

2221  ggggtgcgag ggccacatgg acagaggccg gctcggccca ccctctgccc tgagagtgc
      g v r g p h g q r p a r p t l c p e s d

2281  cgctgtacca acctctgtcc ctacagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc
      r c t n l c p y r a a p r t t g v h p a
                        q p r e p q v y t l

2341  cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt
      p i p g - a d q e p g q p d l p g q r l
      p p s r d e l t k n q v s l t c l v k g

2401  ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa
      l s q r h r r g v g e q w a a g e q l q
      f y p s d i a v e w e s n g q p e n n y

2461  gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcacggt
      d h a s r a g l r r l l l p l q q a h r
      k t t p p v l d s d g s f f l y s k l t

2521  ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct
      g q e q v a a g e r l l m l r d a - g s
      v d k s r w q q g n v f s c s v m h e a

2581  gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaagtag tgcgacggcc
      a q p l h a e e p l p v s g - m s a t a
      l h n h y t q k s l s l s p g k - v r r

2641  gcgact
      a t

```

## 10.2 Chemische Verschiebungen von rekombinantem Uroguanylin

Die in dieser Arbeit bestimmten chemischen Verschiebungen von rekombinant exprimiertem Uroguanylin sind in Tab. 10.1 aufgelistet. Zum Vergleich sind die von Marx *et al.* (1998) bestimmten Verschiebungen von chemisch synthetisiertem Uroguanylin mit angegeben.

Tab. 10.1: Chemische Verschiebungen von rekombinantem Uroguanylin.

rekombinantes Uroguanylin					Marx et al., 1998	
Sequenz	Aminosäure	Gruppe	Atom	$\delta$ [ppm]	$\delta$ [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]
2	ILE	HN	H	8,76	-	-
2	ILE	N	N	125,06	-	-
2	ILE	HA	H	4,18	-	-
2	ILE	HB	H	1,87	-	-
2	ILE	HG	H	0,94	-	-
3	ALA	HN	H	8,57	-	-
3	ALA	N	N	128,82	-	-
3	ALA	HA	H	4,30	-	-
3	ALA	HB	H	1,37	-	-
6	ASP	HN	H	8,52	8,66	-0,14
6	ASP	N	N	119,20	0,00	0,00
6	ASP	HA	H	4,70	4,67	0,03
6	ASP	HB1	H	2,93	2,93	0,00
6	ASP	HB2	H	2,84	2,86	-0,02
7	CYS	HN	H	8,56	8,56	0,00
7	CYS	N	N	118,36	0,00	0,00
7	CYS	HA	H	0,00	4,88	0,00
7	CYS	HB1	H	3,40	3,38	-0,04
7	CYS	HB2	H	2,96	2,96	0,00
8	GLU	HN	H	8,48	8,44	0,04
8	GLU	N	N	122,87	0,00	0,00
8	GLU	HA	H	4,20	4,20	0,00
8	GLU	HB	H	2,13	2,09	0,04
8	GLU	HG	H	2,50	2,49	0,01
9	LEU	HN	H	8,20	8,13	0,07
9	LEU	N	N	118,43	0,00	0,00
9	LEU	HA	H	4,41	4,37	0,04
10	CYS	HN	H	8,50	8,52	-0,02
10	CYS	N	N	116,14	0,00	0,00
10	CYS	HA	H	4,41	4,45	-0,04
10	CYS	HB1	H	3,36	3,32	0,04
10	CYS	HB2	H	2,91	2,89	0,02
11	VAL	HN	H	7,66	7,65	0,01

11	VAL	N	N	116,43	0,00	0,00
11	VAL	HA	H	3,99	4,00	-0,01
11	VAL	HB	H	2,13	2,12	0,01
11	VAL	HG	H	0,94	0,92	0,02
12	ASN	HN	H	7,65	7,69	-0,04
12	ASN	N	N	118,07	0,00	0,00
12	ASN	HA	H	4,81	4,78	0,03
12	ASN	HB1	H	3,07	3,04	0,03
12	ASN	HB2	H	2,80	2,79	0,01
13	VAL	HN	H	8,31	8,28	0,03
13	VAL	N	N	0,00	0,00	0,00
13	VAL	HA	H	3,96	3,94	0,02
13	VAL	HB	H	2,25	2,22	0,03
13	VAL	HG	H	0,97	0,00	-0,01
14	ALA	HN	H	8,28	8,26	0,02
14	ALA	N	N	122,42	0,00	0,00
14	ALA	HA	H	4,31	4,28	0,03
14	ALA	HB	H	1,38	1,36	0,02
15	CYS	HN	H	7,71	7,70	0,01
15	CYS	N	N	118,17	0,00	0,00
15	CYS	HA	H	4,68	4,68	0,00
15	CYS	HB1	H	3,29	3,23	0,06
15	CYS	HB2	H	3,22	3,23	-0,01
16	THR	HN	H	8,57	8,54	0,03
16	THR	N	N	118,78	0,00	0,00
16	THR	HA	H	4,16	4,15	0,01
16	THR	HB	H	4,16	4,15	0,01
16	THR	HG	H	1,25	1,23	0,02
17	GLY	HN	H	8,94	8,90	0,04
17	GLY	N	N	112,34	0,00	0,00
17	GLY	HA1	H	4,06	4,05	0,01
17	GLY	HA2	H	3,87	3,84	0,03
18	CYS	HN	H	7,88	7,88	0,00
18	CYS	N	N	118,20	0,00	0,00
18	CYS	HA	H	4,70	4,66	0,04
18	CYS	HB1	H	3,13	3,08	0,05

18	CYS	HB2	H	3,08	3,08	0,00
19	LEU	HN	H	8,33	8,48	-0,15
19	LEU	N	N	124,48	0,00	0,00
19	LEU	HA	H	4,36	4,40	-0,04
19	LEU	HB	H	1,65	1,67	-0,02
19	LEU	HG	H	1,65	1,65	0,00

### 10.3 Chemische Verschiebungen von rekombinantem STh

Die in dieser Arbeit bestimmten chemischen Verschiebungen von rekombinant exprimiertem STh sind in Tab. 10.2 angegeben. Zum Vergleich sind die von Matecko *et al.* (2009) bestimmten Verschiebungen von chemisch synthetisiertem Uroguanylin mit aufgelistet.

Tab. 10.2: Chemische Verschiebungen von rekombinantem STh.

rekombinantes STh					Matecko <i>et al.</i> , 2009	
Sequenz	Aminosäure	Gruppe	Atom	$\delta$ [ppm]	$\delta$ [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]
10	CYS	HN	H	-	9,33	-
10	CYS	N	N	-	-	-
10	CYS	HA	H	-	-	-
10	CYS	HB1	H	-	3,46	-
10	CYS	HB2	H	-	3,31	-
11	CYS	HN	H	8,27	8,38	-0,11
11	CYS	N	N	121,57	-	-
11	CYS	HA	H	4,41	4,33	0,08
11	CYS	HB1	H	3,07	3,21	-0,04
11	CYS	HB2	H	2,78	2,88	-0,10
12	ASN	HN	H	7,15	7,19	-0,04
12	ASN	N	N	119,40	-	-
12	ASN	HA	H	5,14	5,16	-0,02
12	ASN	HB1	H	2,89	2,89	0,00
12	ASN	HB2	H	2,83	2,82	0,01
13	PRO	N	N	-	-	-

13	PRO	HA	H	4,29	4,31	-0,02
13	PRO	HB	H	-	2,28	-
13	PRO	HD	H	3,71	3,72	-0,01
13	PRO	HG	H	1,93	1,97	-0,04
14	ALA	HN	H	8,47	8,45	0,02
14	ALA	N	N	119,31	-	-
14	ALA	HA	H	4,29	4,31	-0,02
14	ALA	HB	H	1,35	1,37	-0,02
15	CYS	HN	H	7,72	7,69	0,03
15	CYS	N	N	118,66	-	-
15	CYS	HA	H	4,49	4,53	-0,04
15	CYS	HB1	H	3,11	3,18	-0,07
15	CYS	HB2	H	3,11	3,11	0,00
16	THR	HN	HN	8,61	8,60	0,01
16	THR	N	N	120,65	-	-
16	THR	HA	H	4,04	4,07	-0,03
16	THR	HB	H	4,04	4,08	-0,04
16	THR	HG	H	1,27	1,29	-0,02
17	GLY	HN	H	9,03	9,02	0,01
17	GLY	N	N	113,14	-	-
17	GLY	HA1	H	4,04	4,05	-0,01
17	GLY	HA2	H	3,73	3,75	-0,02
18	CYS	HN	H	7,51	7,58	-0,07
18	CYS	N	N	118,03	-	-
18	CYS	HA	H	4,64	4,63	0,01
18	CYS	HB1	H	2,88	2,92	-0,04
18	CYS	HB2	H	2,88	2,92	-0,04
19	TYR	HN	H	8,40	8,38	0,02
19	TYR	N	N	122,21	-	-
19	TYR	HA	H	4,62	4,57	0,05
19	TYR	HB1	H	3,18	3,11	0,07
19	TYR	HB2	H	2,89	2,91	-0,02

## 10.4 Geräteliste

Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim)

Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

Tischzentrifuge Biofuge stratos (Heraeus, Hanau)

Zentrifuge Universal 320 R (Hettich, Tuttlingen)

Kühlzentrifuge Centrikon T-124 (Kontron, Eching)

Gelkammer Mighty Small II SE 250/SE 260 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)

PowerPac 300 (Biorad Laboratories GmbH, München)

PowerPac 3000 (Biorad Laboratories GmbH, München)

Horizontalschüttler KS 501 D (Janke & Kunkel, Staufen)

Geldokumentationssystem GelDoc XR+ (Biorad Laboratories GmbH, München)

pH-Elektrode SenTix 60 (WTW, Weilheim)

Feinwaage TE 124 S (Sartorius Göttingen)

Blockthermostat BT 100 (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden)

Filteranlage Milli-Q Biocel, 0,22 µm (Millipore, Eschborn)

Vortexer VF 2 (Janke & Kunkel, Staufen)

ÄKTApurifier (GE Healthcare Europe, Freiburg)

Vakuumpumpe (Vacubrand GmbH, Wertheim)

Primus 25 advanced Thermocycler (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Elektroporationsgerät MicroPulser (Biorad Laboratories GmbH, München)

Inkubationsschüttler Certomat HK (B. Braun Biotech International, Melsungen)

Brutschrank BE 200 (Memmert, Schwabach)

Incubator Shaker C 25 KC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)

Incubator Shaker Excella E 25 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)

Spectrometer Ultrospec 2100 pro (GE Healthcare Europe GmbH, formerly Amersham Biosciences, Freiburg)

Spectrometer DU 730 (Beckman Coulter, Krefeld)

Spectropolarimeter J-810 S mit Temperatur-Kontrolleinheit CDF-426 S (JASCO, Groß-Umstadt)

NMR-Spektrometer Avance 400 (400 MHz), Avance II+ (600 MHz), Avance 700 (700 MHz) und Avance 800 (800 MHz) (Bruker, Karlsruhe)





## 11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth unter der Leitung und fachlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Paul Rösch angefertigt. Ihm möchte ich in besonderem Maße danken für die Überlassung des Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die er an seinem Lehrstuhl geschaffen hat.

Ich möchte mich weiterhin bei Frau Dr. Hanna Berkner bedanken für die zahlreichen Diskussionen und fachlichen Hilfestellungen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Birgitta Wöhr, Herrn Dr. Kristian Schweimer und Herrn PD Dr. Stephan Schwarzinger, die jederzeit für Fragen offen waren und mich mit Anregungen und Denkanstößen unterstützt haben. Herrn Rainer Hofmann danke ich für seine Unterstützung bei Computer- und Softwareproblemen.

Einige der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse verdanke ich maßgeblich der Kooperation mit hervorragenden Wissenschaftlern aus anderen Arbeitsgruppen. Ich möchte mich bei Herrn Dr. Rainer Schreiber (Institut für Physiologie, Universität Regensburg), Frau Dr. Angela Seebahn und Herrn Dr. Nico Vogel (beide Institut für Biochemie, Universität Erlangen-Nürnberg) für die fruchtbare Zusammenarbeit bedanken. Der Expressionsvektor pCMV\_Nrxn wurde mir von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Markus Missler (Institut für Anatomie u. Molekulare Neurobiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) zur Verfügung gestellt. In diesem Zusammenhang danke ich Herrn Dr. Martin Klose für seine Unterstützung. Außerdem danke ich Herrn Dr. Frank Fischer (Lehrstuhl Biochemie, Universität Bayreuth) für die von ihm durchgeführten massenspektrometrischen Analysen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich das Säugerzellkulturlabor des Lehrstuhls Biochemie der Universität Bayreuth benutzen. Dafür danke ich Herrn Prof. Dr. Clemens Steegborn, der dies ermöglichte.

Ich danke den Studenten, die im Rahmen von Forschungspraktika, Bachelor- und Masterarbeiten zu dieser Arbeit beigetragen haben. Namentlich waren dies Benedikt Weirich, Carolin Schmidtke, Melina Fischer, Philipp Best und Christin Elßner.

Bei allen anderen aktiven und ehemaligen Kollegen am Lehrstuhl Biopolymere bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft.

Schließlich danke ich ganz besonders meinen Eltern, Herrn Richard und Frau Elisabeth Weiglmeier, sowie meiner Schwester Stephanie für ihren uneingeschränkten Rückhalt.

## 12 (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 5 Nr. 4 PromO)

*Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.*

(§ 8 S. 2 Nr. 5 PromO)

*Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.*

(§ 8 S. 2 Nr. 7 PromO)

*Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.  
Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.*

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

*Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerbliche Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.*

.....  
Ort, Datum, Unterschrift